

实验动物与比较医学



期刊网站

Shiyan Dongwu Yu Bijiao Yixue

双月刊 1981年9月创刊

第42卷 第2期 (总第192期)

2022年4月25日出版

主 管

上海科学院

主 办

上海市实验动物学会

上海实验动物研究中心

编 辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主 编

王 健

执行主编

吴宝金

出 版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

富群华

印 刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发 行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发售

邮发代号: 4-789

零 售

《实验动物与比较医学》编辑部

201203, 上海市金科路3577号

电话: 021-50793657

联系人: 王伟民

定 价

每期30.00元, 全年180.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版 权 声 明

2022年版权归《实验动物与比较医学》
编辑委员会所有。

作者向本刊投稿, 即视为愿意将著作
(包括但不限于信息网络传播权等) 授
予本刊。不同意者请在投稿时声明。

除非特别说明, 本刊刊出的所有文章不
代表本刊编委会及主办单位的观点。

如有印刷或装订质量问题, 请向本刊编辑部
调换。

目 次

实验动物与生物安全专题

实验动物身份识别与追踪技术在生物安全实验室的应用前景

陈丽香, 秦波音, 杨华, 徐春华, 彭秀华, 李顺, 周晓辉 89

实验动物屏障设施管理中面临的生物安全问题及对策探讨

杨玉琴 95

自主研发生物安全型换笼工作台的性能检测与评价

苏世博, 马文杰, 王伟, 郭慧娟, 张贺, 王梓, 康雷, 刘守琦,
刘怀然, 司昌德, 苟春天, 张伟, 陈洪岩 102

部分兽医相关单位Ⅱ级生物安全柜的性能测试与分析

马文杰, 张伟, 王伟, 苏世博, 郭慧娟, 张贺, 王梓, 刘怀然,
陈洪岩 111

微电解无菌水系统在实验动物屏障设施中应用的跟踪监测

张薇, 唐彬, 赵勇, 张志妮, 邓新燕 117

实验动物尸体及相关废弃物无害化处置信息化监管系统初探

李勇, 周亮, 何勇, 闫志峰, 王海江 122

人类疾病动物模型

适用于微创消融治疗研究的小鼠胰腺癌原位模型建立方法及比较

毛璐婧, 张娜娜, 刘昊, 史爱华, 朱子语, 吕毅 127

利格列汀对2型糖尿病大鼠肾组织纤维化过程中骨膜蛋白及
转化生长因子- β 1的影响

弓慧杰, 张光明 135

花生四烯酸诱导建立大鼠弥漫性脑血栓模型

宁琰, 孙航, 冯晋, 孟庆婷, 杨茜, 何芳雁 141

胰腺星状细胞与胰腺疾病模型研究进展

魏迅, 江霞, 郑羽旋, 张乐文, 周正宇 146

实验动物福利与伦理

环境丰富对英国短毛猫应激相关指标的改善作用

陈鸿婷, 杨斐, 胡樱..... 152

离体豚鼠回肠法应用于骨肽类注射剂中组胺类物质检测

吴 畅, 李晓洁, 吴殷因, 王瑶, 汪玉馨, 宗卫峰, 孟长虹, 陆益红..... 159

电极植入猕猴脑皮层手术的护理实践及探讨

徐西彬, 朱青, 张恩..... 166

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会名单..... 前插8

《实验动物与比较医学》第2届优秀论文及优秀审稿人获奖名单..... 英文目次页后插页

《中华人民共和国生物安全法》: 病原微生物实验室生物安全..... 94

《中华人民共和国生物安全法》: 生物安全能力建设..... 110

《中华人民共和国生物安全法》: 生物技术研究、开发与应用安全..... 126

《中华人民共和国生物安全法》: 防控重大新发突发传染病、动植物疫情..... 170

关于本刊论文格式的新要求..... 101

更正启事..... 134

《实验动物与比较医学》2022年征订启事..... 145

书讯:《眼科学动物实验基础与技术》..... 165

广告..... 封二, 前插1-7, 后插1-6, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*82*zh*P*¥30.00*2000*13*2022-04

(经方正字库授权, 本刊使用字体包括方正雅宋系列、方正兰亭黑pro global系列、方正金陵系列、方正Capitolium系列、方正盛世楷书系列等)

本期责任编辑 张 周

本期审稿专家 白 玉(北京) 白 玉(石家庄) 陈民利 丁玉强 高 诚 高 静

黄 纓 黎 明 李 静 李晓燕 李 垚 刘吉宏 师长宏 施爱民

王 健 王玉娥 魏 强 吴宝金 徐 平 姚 明 曾 林 张 周

赵 勇 周光兴 周晓辉 (以姓氏拼音排序)

本期责任编辑 张俊彦

本期责任编辑 张俊彦 周 烁(实习) 周晓铎(实习) 周 培(实习)

本期中英文校对 富群华 丁宇菁 孙 琛

本期实习编辑 周晓铎 郭嘉欣 赵宇朋 周 烁 任益凡 洪 怡

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 42, Issue 2

April 25, 2022

Directed by

Shanghai Academy of Science and
Technology

Sponsored by

Shanghai Laboratory Animal Science
Association
Shanghai Laboratory Animal Research
Center

Edited by

Editorial Board of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*

Editor-in-Chief

WANG Jian

Executive Editor-in-Chief

WU Baojin

Published by

Editorial Office of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*
3577 Jinke Road, Pudong District,
Shanghai 201203, China
Tel: 0086-21-50793657
E-mail: bjb50793657@163.com
<http://www.slarc.org.cn/dwyx>

Managing Editor

FU Qunhua

Printed by

Shanghai Newcabo Business Printing
Co., Ltd.

Distributed by

Shanghai Postal Bureau of Press Issuing
Postal code: 4-789

Price

RMB 30.00 per issue

CSSN

ISSN 1674-5817
CN 31-1954/Q

Copyright© 2022 by the Editorial

Board of *Laboratory Animal and
Comparative Medicine*

No content published by the journal of *Laboratory
Animal and Comparative Medicine* may be
reproduced or abridged without authorization.

All articles published represent the opinions of the
authors, and do not reflect the official policy of
the Editorial Board of *Laboratory Animal and
Comparative Medicine*, unless this is clearly
specified.

Executive Editor for This Issue

ZHANG Junyan

CONTENTS IN BRIEF

Laboratory Animal and Biosafety

Application Prospect of Identification and Traceability Technology of Laboratory
Animals in Biosafety Laboratory

CHEN Lixiang, QIN Boyin, YANG Hua, XU Chunhua, PENG Xiuhua, LI Shun,
ZHOU Xiaohui 89

Biosafety Problems and Countermeasures in the Management of Barrier Facilities
for Laboratory Animals

YANG Yuqin 95

Performance Test and Evaluation of Self-developed Biosafety Cage Changing
Workbench

SU Shibo, MA Wenjie, WANG Wei, GUO Huijuan, ZHANG He, WANG Zi,
KANG Lei, LIU Shouqi, LIU Huairan, SI Changde, GOU Chuntian,
ZHANG Wei, CHEN Hongyan 102

Performance Analysis of Class II Biosafety Cabinetry in Veterinary-related Research
Institutes

MA Wenjie, ZHANG Wei, WANG Wei, SU Shibo, GUO Huijuan, ZHANG He,
WANG Zi, LIU Huairan, CHEN Hongyan 111

Tracking and Monitoring on Application of Micro-electrolyzed Sterile Water System
in Laboratory Animal Barrier Facilities

ZHANG Wei, TANG Bin, ZHAO Yong, ZHANG Zhini, DENG Xinyan 117

Preliminary Exploration of Information Supervision System for Harmless Disposal of
Laboratory Animal Carcasses and Related Wastes

LI Yong, ZHOU Liang, HE Yong, YAN Zhifeng, WANG Haijiang 122

Animal Models of Human Diseases

Establishment and Comparison of Mouse Pancreatic Cancer Orthotopic Model for
Minimally Invasive Ablation Therapy Study

MAO Lujing, ZHANG Nana, LIU Hao, SHI Aihua, ZHU Ziyu, LÜ Yi 128

Effects of Inagliptin on the Expression of Periosteal and TGF- β 1 in Renal Fibrosis
of Type 2 Diabetic Rats

GONG Huijie, ZHANG Guangming 135

Model of Diffuse Cerebral Thrombosis Induced by Arachidonic Acid in Rats

NING Long, SUN Hang, FENG Jin, MENG Qingting, YANG Qian, HE Fangyan 141

Progress of Pancreatic Stellate Cells in Research of Pancreatic Disease Model

WEI Xun, JIANG Xia, ZHENG Yuxuan, ZHANG Lewen, ZHOU Zhengyu 146

Laboratory Animal Welfare and Ethics

Improving Effect of Environmental Enrichment on Stress-related Indicators of British-
shorthair Cats

CHEN Hongting, YANG Fei, HU Ying 152

Application of Isolated Guinea Pig Ileum Method for Detection of Histamine Substances
in Osteopeptide Injections

WU Chang, LI Xiaojie, WU Yinnan, WANG Yao, WANG Yuxin, ZONG Weifeng,
MENG Changhong, LU Yihong 159

Nursing Practice and Discussion of Electrode Implantation into Cerebral Cortex of
Rhesus Monkey

XU Xibin, ZHU Qing, ZHANG En 166

《实验动物与比较医学》第2届(2019—2021年)优秀论文获奖名单

《树鼩在生物医学研究中的优势与挑战》	贾 杰,等
《基于多重PCR靶向二代测序的近交系小鼠遗传质量监测方法建立》	钱 强,等
《不同时间紫外线照射对SD大鼠的皮肤光毒性损伤作用》	孙 侠,等
《基于浏览器/服务器模式架构的高校动物实验管理系统开发与应用》	徐孝平,等
《黄芪注射液对db/db小鼠肾脏IL-1 β 、MCP-1和TNF- α 的mRNA表达的影响》	朱丽坤,等
《不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型》	董若曦,等
《用高热量饲料建立大鼠肥胖模型的实验研究》	吕晓君,等
《芍药苷对Bayk8644诱导大鼠抑郁焦虑样行为的改善作用及机制研究》	李 萍,等
《葡聚糖硫酸钠不同给药方式建立小鼠溃疡性结肠炎模型》	赵亚妮,等
《高脂饲料诱导代谢性疾病动物模型》	罗建波,等
《痰热清注射液的安全药理学动物实验评价》	胡 俊,等
《医院科研工作中开展实验动物福利伦理教育的探索》	余 飞,等
《脑缺血动物模型的制备及评估进展》	胡志斌,等
《CNAS实验动物机构认可进展》	吴孝槐
《大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察比较》	赵宇朋,等
《皮肤光老化小鼠模型的构建及效果评估》	孔 悦,等
《2020版美国兽医协会动物安乐死指南解析》	卢 今,等
《利用基质胶阻断门静脉建立改良ALPPS手术小鼠模型》	沈 皓,等
《云南省实验动物工作40年发展历程与思考》	罕园园,等
《两种不同类型实验动物屏障设施的气流组织计算流体力学模拟技术分析》	周 斌,等

《实验动物与比较医学》第2届(2021年)优秀审稿人获奖名单

王 宇(上海市食品药品检验研究院)	傅江南(暨南大学实验动物管理中心)
戴 炯(上海交通大学医学院附属仁济医院)	庞晓斌(河南大学药学院)
黎 明(英崴沃<上海>生物科技有限公司)	艾志福(江西中医药大学实验动物科技中心)
施爱民(南京医科大学医药实验动物中心)	陈 丽(安徽医科大学实验动物中心)
贺争鸣(中国食品药品检定研究院)	赵 勇(上海实验动物研究中心)
施 恩(上海斯莱克实验动物有限责任公司)	崔永春(中国医学科学院阜外医院动物实验中心)
孙德明(国家卫生健康委科学技术研究所)	倪丽菊(上海实验动物研究中心)
卢 晓(迪哲<上海>医药有限公司)	彭长庚(同济大学医学院)
王春霞(上海市儿童医院)	邵奇鸣(西安国联质量检测股份有限公司)
徐汪节(上海交通大学实验动物中心)	曾 林(军事医学研究院实验动物中心)



周晓辉, 博士, 研究员, 上海市公共卫生临床中心实验动物部主任, 上海市新发与再现传染病研究所副所长、感染动物模型课题组PI。复旦大学博士毕业后曾在加拿大达尔豪西大学、美国托马斯杰弗逊大学、宾夕法尼亚大学作博士后或研究学者。至今在 *Nature*、*Cell Death Differ*、*PLoS Pathog* 等国内外专业期刊发表论文 50 余篇。申请国家发明专利 4 项 (授权 1 项), 获上海市优秀发明选拔赛银奖 2 项。主持及承担国家自然科学基金项目、国家重点基础研究发展计划、国家十三五重大专项、国家重点研发计划、上海市自然科学基金、上海市科学技术委员会实验动物专项等项目。同时担任中国实验动物学会动物实验生物安全委员会副主任委员、实验动物标准化委员会委员, 上海市实验动物学会常务理事、生物安全专业委员会主任委员, *Animal Model Exp Med* 和《中国比较医学杂志》副主编、*Front Microbiol* 客座副主编、《实验动物与比较医学》常务编委等职务。

实验动物身份识别与追踪技术在生物安全实验室的应用前景

陈丽香, 秦波音, 杨 华, 徐春华, 彭秀华, 李 顺, 周晓辉

(上海市公共卫生临床中心, 上海 201508)

[摘要] 生物安全实验室的有效、安全管理是保障国家生物安全的重要环节之一。作为生物医学研究最广泛的材料之一, 实验动物被大量应用于各类感染相关的生物安全实验研究中, 而感染性动物实验必须在动物生物安全实验室中开展。在动物生物安全实验室中, 实验动物及动物实验相关的风险评估与控制至关重要。通过无线追踪技术实现实验动物身份识别及可追溯性是未来动物生物安全实验室风险控制与管理的重要手段之一。本文对实验动物身份识别及追踪技术进行了概括, 并描述了无接触识别技术尤其是无线射频识别技术在实验动物生物安全管控中的应用前景, 可为相关从业人员更好地应用实验动物身份识别与追踪技术进行生物安全管控提供参考。

[关键词] 生物安全; 实验动物; 可追踪技术; 身份识别

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0089-06

Application Prospect of Identification and Traceability Technology of Laboratory Animals in Biosafety Laboratory

CHEN Lixiang, QIN Boyin, YANG Hua, XU Chunhua, PENG Xiuhua, LI Shun, ZHOU Xiaohui

(Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China)

Correspondence to: ZHOU Xiaohui, E-mail: zhouxiaohui@shaphc.org.cn

[ABSTRACT] Effective management of laboratory biosafety plays one of the most important roles in the national biosafety system. Laboratory animals have been widely used in the life science research field, including infection animal experiments, which have to be done in the animal biosafety laboratory (ABSL). The risk assessment and control related to laboratory animals and animal experiments are the most important affairs in ABSL, and the identification and traceability of laboratory animals detected by wireless tracking technology represent a developing tendency in ABSL management. From the perspective of biosafety, this paper summarized the development of laboratory animal identification and traceability

[基金项目] 上海市科学技术委员会科技计划项目子课题: 生物安全实验室实验动物信息可追溯系统应用评价研究(21140900202); 上海市科学技术委员会实验动物研究领域项目(19140905300)

[作者简介] 陈丽香(1988—), 女, 硕士, 主要从事实验动物学及细胞死亡通路研究。E-mail: xiaripaomo@126.com

[通信作者] 周晓辉(1973—), 男, 研究员, 从事实验动物学、病原生物学研究。E-mail: zhouxiaohui@shaphc.org.cn

technology, and described the application prospect in ABSL management of non-contact identification technology, especially radio frequency identification technology, which can provide reference for relevant practitioners to use the identification and traceability technology of experimental animals for biosafety control.

[Key words] Biosafety; Experimental animals; Traceability technology; Identification

生物安全实验室的有效安全管理是保障国家生物安全的重要环节之一。生物安全实验室内实施有效的生物安全管控已是国家生物安全保障的重要组成部分。在生物安全实验室中,实验动物常被用于病原体感染机制等生物医学研究,以及疫苗与药物评价等诸多科学实验,是保障人类健康、安全的特殊试验品^[1]。其中,动物生物安全实验室应当加强对实验动物的管理,防止实验动物逃逸,并且对使用后的实验动物应进行无害化处理,实现实验动物可追溯,禁止将使用后的实验物流入市场^[2]。因此,针对实验动物进行有效、便捷的标记是保障实验动物质量、顺利开展动物实验相关的科学研究和实现实验动物可追溯性管理的基础^[3],也是实验动物生物安全管理的重要手段之一。

实验动物标记方法主要包括染色法、耳标法等传统方法,以及以二维码和无线射频识别技术(radio frequency identification, RFID)为代表的电子标记技术。其中RFID作为物联网的前端,具有信息量大、无接触识别等优点^[4-5],目前已被应用于动物饲养管理、样品跟踪分析等过程。然而在动物生物安全实验室中尚未见应用RFID进行实验动物生命活动全过程跟踪的报告。本文对生物安全实验室中动物管理需求及动物识别标记技术的研究现状进行概述,提示RFID识别技术无需人工干预并可对实验动物进行实时跟踪,从而在动物生物安全实验室的动物可追溯管理中具有重要的应用前景,值得进一步探索推广。

1 生物安全与实验动物管理需求

生物安全是指国家有效防范和应对危险生物因子及相关因素威胁,生物技术能够稳定健康发展,人民生命健康和生态系统相对处于没有危险和不受威胁的状态,生物领域具备维护国家安全和持续发展的能力。生物安全实验室是一种特殊的科学研究实验室,该类实验室中主要从事与病原微生物菌(毒)种和样本有关的研究、教学、检测、诊断等活动,按操作病原的危害等级和防护水平,可分为BSL-1、BSL-2、BSL-3和BSL-4四级^[6]。由此可知,生物领域内实施有效的

生物安全管控已是保障国家生物安全的重要环节。

我国的生物安全实验室建设起步相对较晚^[7-8]。在20世纪80年代后期,我国建成了第一座初步具有生物安全三级防护水平的实验室(即BSL-3),但当时的生物安全实验室建设和管理尚没有统一的标准^[9]。2003年严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)疫情暴发以来,生物安全实验室的管理问题开始引起我国政府及相关职能部门的高度重视^[7],政府层面陆续修订或颁布了一系列的要求及法规标准,包括《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《实验室生物安全通用要求》、《动物病原微生物名录》、《人间传染的病原微生物名录》、《中华人民共和国传染病防治法》;此外,2016年国家发改委、科技部制定了生物安全实验室体系建设规划;2017年国家卫生和计划生育委员会发布了卫生行业的《病原微生物实验室生物安全通用准则》,对管理和技术要求均作了进一步的明确^[10]。这些法规标准的发布有力推进了实验室感染防控力度的加强,降低了实验室事故发生率,标志着我国步入了法制化管理病原微生物实验室的轨道。尤为重要的是,2020年我国在生物安全领域的第一则法律——《中华人民共和国生物安全法》正式颁布(2021年4月15日开始施行),标志着我国生物安全实验室的建设和管理已经走向成熟阶段,该法对我国生物安全实验室的管理提出了更高的要求。

实验动物主要是指在特定标准环境下通过人工培育生长繁殖的特殊动物,常被用于生物医学探索、药物评价等诸多与生命健康息息相关的科学实验研究,是不可替代的特殊试验品^[11]。开展动物实验的生物安全实验室称为动物生物安全实验室,也分为ABSL-1、ABSL-2、ABSL-3和ABSL-4四级^[12]。为避免在动物生物安全实验室内发生动物实验危险事故,应重点关注三个方面的内容:一是应严格按照国家法律法规标准规范等要求使用实验动物。动物实验之前应了解实验拟使用的病原微生物背景,做好人兽共患病的病原污染应急预案,做好防控工作,确保人员健康、环境安全,以便实验顺利开展。二是遵循动物福利标准。

在进行动物实验研究时,尽量减少人为干预,降低对动物的伤害。三是要防止动物逃逸^[13]。《中华人民共和国生物安全法》第五章四十七条指出病原微生物实验室应当在实验动物方面加强管理和采取防范措施,严格控制实验动物逃逸和遵照国家规定进行实验动物无害化处理,实现实验动物生命全过程可追溯;第九章第七十七条指出,如违反生物安全法规定,把使用后的实验动物流入市场的将进行相应处罚,情节严重者甚至会被依法吊销相关许可证件。由此可见,在动物生物安全实验室中防止动物逃逸、监管动物去向、实现实验动物的可追溯管理是目前实验动物生物安全领域亟需解决的问题。

2 实验动物标记技术与信息化管理现状

2.1 传统实验动物标记技术

长期以来,为了实现实验动物的准确识别,保证动物个体之间不被混淆,研究人员采用了多种传统标记方法。啮齿类动物实验常用的标记方法主要有染色法、剃毛法、耳标法、仪器尾部号码纹身标记法、耳孔法、断趾法等。但传统方法有一定的弊端,如染色法主要用于大鼠、小鼠和兔,使用的染料可能存在潜在毒性,易对动物健康及实验结果造成影响^[1, 3];剃毛法主要用于中大型动物如犬、兔,该方法操作简单,但需要抓取保定,且标记时效短,只能标记少量动物;耳标法适用于多种动物且成本低、可标记数量大的动物群体,但该方法也需要进行动物抓取保定,且耳标存在丢失的风险,此外有研究表明长期佩戴金属耳标易引起耳部炎性反应等^[14];纹身法需要对动物进行麻醉,使用的染料也可能存在毒性;耳孔法一般适用于啮齿类小动物如大鼠、小鼠,其对动物有一定伤害,易引起应激反应,另外标记或识别动物时均需要进行动物抓取,工作量大,且需要提前绘制图谱并进行培训才可有效识别;断趾法会导致动物疼痛和伤害,违反动物福利伦理要求,已不被推荐使用^[1]。

非人灵长类动物因与人类高度相似,已被广泛应用于疫苗研究和药物评价实验中。传统的灵长类动物标记方法主要有染色法、套圈法、剃毛法。但毛发染色可能引起动物过敏,剃毛法和染色法的可识别时间都较短,通常不足一个月,限制了它们的使用范围;而套圈法是指给动物佩戴项圈以进行标记,但项圈的长期佩戴会影响动物行为及健康^[1]。

综上所述,传统的标记方法识别工作量大,而且

需要实验人员花费大量时间方可完成实验对应的动物所有信息资料的录入,容易产生误写、误记现象,影响实验结果的准确性和可追溯性,已无法适应动物生物安全实验室中应用场景的发展需求。

2.2 自动识别技术研究进展及在实验动物领域的应用

当前,物联网建设已成为国家未来发展战略之一。在物联网整个产业链中,前端的数据采集与识别技术是实现物联网的核心关键技术。目前在物联网相关的识别技术中,二维码和RFID作为自动识别及溯源系统建设的两大主流技术已经被广泛应用。条码识别技术在20世纪80年代末期开始在我国得到一定的推广^[15],其中的二维码技术逐渐应用于实验动物领域,例如在动物耳标上采用条形码进行动物编号标记^[3]等,通过专用识读器读取二维码信息,最终与中央数据库相连,即可实现动物防疫、检疫、饲养等环节多种信息的查询,达到溯源目的。二维码技术因成本较低,目前已被广泛应用,但长时间使用二维码会存在识读困难的情况,且二维码无法实现无接触识别,需要借助耳标等介质,不适宜于活体编码;尤其在生物安全实验室,特别是生物安全二级以上屏障系统的动物实验室内,使用二维码标记仍无法解决工作量大、暴露风险高的问题。

随着生物技术和通信技术的发展,目前以RFID为代表的新型识别技术共存的多种技术识别体系已经在实验动物识别领域逐渐形成。RFID位于物联网的感知层,技术人员可用它随时随地通过无线电信号识别特定目标,并获取目标物体的相关信息,因此是一种非接触式的目标自动识别技术和数据采集技术^[16-17]。RFID标签因具有可读写能力、数据存储量大、经久耐用、非接触性识别、无需人工干预、环境适应能力强等优点,与现在被广泛应用的条形码相比,优势明显,已成为自动识别技术的关键之一^[3, 18]。

近年来有研究表明,RFID技术可在畜禽类动物个体行为如畜禽采食、饮水行为、产蛋行为监测方面进行有效应用^[19-20]。在实验动物的跟踪和数据采集上,RFID技术应用已有以下报道:(1)美国佛罗里达大学实验室通过RFID标记小鼠笼盒实现5万只小鼠的溯源管理工作^[20-22];(2)中国台湾麦德凯生命科学研究所用RFID标记所有的饲养室、饲养笼架及饲养笼,将RFID应用于实验动物饲养管理流程,同时也尝试将主动式RFID芯片植入实验动物体内,从而建立身份识别

系统,进行全时间溯源^[20-22]; (3) 英国研究者借助小鼠RFID标签标记技术和红外视频采集技术建立了对群体内小鼠个体行为和位置进行实时观察和自动分析的群体笼盒分析系统(home cage analysis, HCA)^[23-24]; (4) 加拿大研究者通过将RFID标签植入小鼠颈部皮下,并结合体质量测量仪器,建立了可实现多只小鼠体质量测量的自动系统^[25]; (5) 中国科学院半导体研究所针对动物体温测量,设计制作了一种新型温度传感器,可嵌入RFID标签并植入动物体内,同时实现目标识别和体温检测^[26]; (6) 为了进行啮齿类动物模型的行为学研究,德国研究团队开发出SocialScan动物社交行为分析仪器与RFID标签联合使用的视频跟踪技术^[27]。此外,RFID与地理信息系统(geographic information systems, GIS)、全球卫星定位(global positioning system, GPS)相结合,实现动物位置信息跟踪,也是近年来在电子标记和信息化系统建立技术方面的新突破^[28]。如果在生物安全实验室中对实验动物进行RFID电子标记,每个动物都相当于一个记录单元,它的位置信息均可被实时监控,通过系统与手机关联,下载系统APP可以随时无接触查看动物移动轨迹,如发生变化,可提示饲养人员该动物可能发生逃逸,应及时进行紧急处理。因此,基于RFID等的自动识别技术,在动物生物安全实验室中有广泛的应用前景。

3 自动识别技术在动物生物安全实验室内的应用前景

动物生物安全实验室,特别是生物安全Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ实验室均为负压屏障环境,穿戴相应个人防护装备的实验人员操作动物时相对难度更大,实验室内动物实验活动一旦未能有效防范危险,与一般实验室相比,潜在风险和危害巨大,将可能造成严重的人员暴露及环境污染。为了进行有效的生物安全防控,实验室从业人员需要预先对实验过程中可能存在的各种风险进行评估,并提前采取防控措施,最终达到减少生物安全事件发生以及降低由此带来的损失的目标^[10, 29]。在动物生物安全实验室中,动物相关风险识别的主要环节有以下几点: (1) 动物实验过程中感染性动物逃逸,导致污染扩散; (2) 动物抓伤或咬伤饲养或实验人员,导致人员感染; (3) 动物实验废弃物及感染性动物尸体处理不当,导致环境污染及人员感染^[30-31]。

在动物生物安全实验室内,对实验动物进行RFID

标记结合数据采集及分析系统后,可实现无接触识别、动物信息自动采集; RFID结合实时定位技术,可实时监测动物位置。当发生动物逃逸时,信息系统可以跟踪动物逃逸位置,有利于防控,能实现及时捕捉,并且通过系统数据分析可获取动物所有生命信息,得知逃逸动物是否感染病原微生物,便于研究人员制定相应的应急处理措施,有效控制传染,降低危害。另外,动物生物安全实验室内生物安全暴露风险较高,频繁的人员干预不仅不利于生物安全管控,还会引起动物应激反应。运用RFID等无接触识别技术可以实现生物安全实验室中实验动物的身份识别与追踪,可以减少人员与动物的接触操作,降低抓咬伤的发生率。此外运用RFID等进行动物标记,建立动物全生命过程监控系统,可跟进监督动物无害化处理过程,防止污染物泄露^[11-12],并且可以实现动物尸体个体化溯源追踪和全流程管理,减少尸体处理过程中的不确定因素,避免病原体扩散。未来在生物安全实验室内进行动物实验时,通过RFID技术对动物进行标记,每个动物都拥有独有的数字身份,同时基于实时定位的数据信息系统实现动物位置跟踪,实现数据采集的自动化及信息可追溯,将是实现生物安全有效管理的重大突破。

此外,除了二维码技术和RFID技术,2020年中国研究团队在《iScience》上报告了一套较为完整的动物面部个体识别跟踪系统: Tri-AI^[32]。未来如果该面部识别系统应用于猕猴等灵长类实验动物或者豚鼠、兔、犬等动物生物安全实验室中,也将大大推进实验动物可追溯系统的建立和生物安全管理。

4 结语与展望

本文对目前的动物标记和识别方法进行了初步分析,从生物安全角度阐述了自动识别技术及可追溯系统建立的必要性。2020年国家生物安全法出台,实验室生物安全问题日益受到社会的广泛关注。在生物科学研究过程中,对实验动物引入、实验、无害化处理等环节进行准确、高效追踪和管理,将是解决动物实验生物安全问题的有力保障。

目前自动识别技术和可追溯技术已开始被应用于实验动物领域,尤其是RFID电子标签因其可实现从动物出生到死亡的全过程追踪,并拥有编码唯一性、可实现无障碍阅读、数据存储量大、识别间距远、读取率高、防干扰能力较强、可实现个体编码等特点^[15],已成为国内外自动标记研究及推广的焦点。未来以

RFID技术为识别基础,融合动物体征感应、体质量测量、实时定位分析等技术的可追溯系统的建立将是生物安全实验室保障安全管理的关键着力点。总之,以RFID等为代表的新型标记技术可实现实验动物背景信息、实验信息、无害化处理信息等综合管理可追溯,在实验动物领域具有广阔的应用前景。

[作者贡献]

陈丽香:负责文章的文献查阅和整理,文章撰写与修改;

秦波音:负责部分文献资料查阅,讨论;

杨华:负责生物安全相关知识讨论,梳理;

徐春华:参与文章思路及整体内容的讨论;

彭秀华:参与文章思路及整体内容的讨论;

李顺:提供文章整体内容的修改建议;

周晓辉:对全文内容进行修改指导。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 史光华, 张晓迪, 吕龙宝, 等. 实验动物机构标记系统的比较研究[J]. 实验动物科学, 2017, 34(3): 55-60, 65. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2017.03.012.
- [2] 《中华人民共和国生物安全法》摘录: 病原微生物实验室生物安全[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 465.
- [3] DAHLBORN K, BUGNON P, NEVALAINEN T, et al. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification[J]. Lab Anim, 2013, 47(1): 2-11. DOI: 10.1177/002367712473290.
- [4] KUMAR P, REINITZ H W, SIMUNOVIC J, et al. Overview of RFID technology and its applications in the food industry[J]. J Food Sci, 2009, 74(8): R101-R106. DOI: 10.1111/j. 1750-3841. 2009.01323.x.
- [5] CUI L, ZHANG Z H, GAO N, et al. Radio frequency identification and sensing techniques and their applications: A review of the state-of-the-art[J]. Sensors (Basel), 2019, 19(18): 4012. DOI: 10.3390/s19184012.
- [6] 周永运, 王荣, 翟培军, 等. 实验动物与生物安全研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2015(12): 4-6. DOI: 10.3969/J. ISSN. 1671-6027.2015.12.001.
- [7] 李俊勇, 赵文红, 杨智明. 吸取SARS实验室感染教训预防鼠疫实验室感染发生[J]. 医学动物防制, 2006(2): 85-86. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6245.2006.02.003.
- [8] 刘静, 李超, 柳金雄, 等. 高等级生物安全实验室在生物安全领域的作用及其发展的思考[J]. 中国农业科学, 2020, 053(001): 74-80. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.01.007.
- [9] 陆兵, 李京京, 程洪亮, 等. 我国生物安全实验室建设和管理现状[J]. 实验室研究与探索, 2012, 031(001): 192-196. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7167.2012.01.055.
- [10] 王君玮. 我国实验室生物安全发展现状与趋势[J]. 中国家禽, 2010, 32(14): 1-4, 8. DOI: 10.16372/j.issn.1004-6364.2010.14.001.
- [11] 白殿卿. 实验猴身份自动识别、自动捕捉、电子芯片数据信息管理系统研制[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(7): 50-54. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.011.
- [12] 薛康宁, 李晓燕, 荣蓉, 等. 动物生物安全二级实验室实验活动管理要点探讨[J]. 实验动物科学, 2014, 31(5): 42-45. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.05.010.
- [13] MCCORMICK-ELL J, CONNELL N. Laboratory safety, biosecurity, and responsible animal use[J]. ILAR J, 2019, 60(1): 24-33. DOI: 10.1093/ilar/ilz012.
- [14] BLANCHARD K T, BARTHEL C, FRENCH J E, et al. Transponder-induced sarcoma in the heterozygous p53^{+/-} mouse[J]. Toxicol Pathol, 1999, 27(5): 519-527. DOI: 10.1177/019262339902700505.
- [15] 易爱华, 赵晓宏, 康卫勇, 等. 条码技术发展现状及其在环保领域的应用探索[J]. 环境与可持续发展, 2014, 39(6): 107-111. DOI: 10.19758/j.cnki.issn1673-288x.2014.06.028.
- [16] 曹闻乐, 于洪涛. 无线射频识别技术在物联网方向的应用[J]. 科学技术创新, 2020(22): 107-108. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1328.2020.22.064.
- [17] VOULODIMOS A S, PATRIKAKIS C Z, SIDERIDIS A B, et al. A complete farm management system based on animal identification using RFID technology[J]. Comput Electron Agric, 2010, 70(2): 380-388. DOI: 10.1016/j.compag.2009.07.009.
- [18] GRUDA M C, PINTO A, CRAELIUS A, et al. A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(6): 826-831. DOI: 10.1093/mollus/eyq030.
- [19] ISERBYT A, GRIFFIOEN M, BORREMANS B, et al. How to quantify animal activity from radio-frequency identification (RFID) recordings[J]. Ecol Evol, 2018, 8(20): 10166-10174. DOI: 10.1002/ece3.4491.
- [20] 刘雄伟, 沈志敏, 魏晓峰, 等. 小鼠植入 RFID 芯片生理生化值的测定[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(3): 238-240. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2012.03.014.
- [21] 陈懿斐, 魏晓峰, 高诚, 等. RFID 技术在实验动物行业中的应用的探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(1): 51-53, 56. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2016.01.010.
- [22] 黄孟选, 李丽华, 许利军, 等. RFID 技术在动物个体行为识别中的应用进展[J]. 中国家禽, 2018, 40(22): 39-44. DOI: 10.16372/j.issn.1004-6364.2018.22.009.
- [23] ZELDOVICH L. RFID: untangling mutant phenotypes[J]. Lab Anim, 2016, 45(11): 427-430. DOI: 10.1038/labani.1146.
- [24] BAINS R S, CATER H L, SILLITO R R, et al. Analysis of individual mouse activity in group housed animals of different inbred strains using a novel automated home cage analysis system[J]. Front Behav Neurosci, 2016, 10: 106. DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00106.
- [25] NOORSHAMS O, BOYD J D, MURPHY T H. Automating mouse weighing in group homecages with Raspberry Pi micro-computers[J]. J Neurosci Methods, 2017, 285: 1-5. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2017.05.002.
- [26] 伏仕波, 肖宛昂, 毛文宇, 等. 一种面向植入式 RFID 标签的温度传感器[J]. 微电子学, 2019, 49(6): 772-776, 782. DOI: 10.13911/j.cnki.1004-3365.190064.
- [27] PELEH T, BAI X S, KAS M J H, et al. RFID-supported video tracking for automated analysis of social behaviour in groups

- of mice[J]. J Neurosci Methods, 2019, 325:108323. DOI:10.1016/j.jneumeth.2019.108323.
- [28] 刘秀敏, 魏冬霞. RFID技术在畜牧业中的应用探析[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(1): 78-80. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1182.2020.01.016.
- [29] ROJO-MOLINERO E, ALADOS J C, DE LA PEDROSA E G, et al. Safety in the microbiology laboratory[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015, 33(6):404-410. DOI:10.1016/j.eimc.2014.06.014.
- [30] 胡凯, 马宏, 贾松树, 等. 实验室生物安全风险评估的现状与思考[J]. 医学动物防制, 2020, 36(9):817-820. DOI:10.7629/yxdwzfz.202009001.
- [31] 周淑佩, 田枫, 贾光. 实验动物从业人员的职业安全及个人防护[J]. 实验动物科学, 2013, 30(1): 50-54. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.01.014.
- [32] GUO S T, XU P F, MIAO Q G, et al. Automatic identification of individual Primates with deep learning techniques[J]. iScience, 2020, 23(8):101412. DOI:10.1016/j.isci.2020.101412.
- (收稿日期:2021-11-27 修回日期:2022-02-10)
- (本文编辑:张俊彦, 周晓铎)

《中华人民共和国生物安全法》：病原微生物实验室生物安全

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过，自2021年4月15日起施行。

第五章 病原微生物实验室生物安全

第四十二条 国家加强对病原微生物实验室生物安全的管理，制定统一的实验室生物安全标准。病原微生物实验室应当符合生物安全国家标准和要求。从事病原微生物实验活动，应当严格遵守有关国家标准和实验室技术规范、操作规程，采取安全防范措施。

第四十三条 国家根据病原微生物的传染性、感染后对人和动物的个体或者群体的危害程度，对病原微生物实行分类管理。

从事高致病性或者疑似高致病性病原微生物样本采集、保藏、运输活动，应当具备相应条件，符合生物安全管理规范。具体办法由国务院卫生健康、农业农村主管部门制定。

第四十四条 设立病原微生物实验室，应当依法取得批准或者进行备案。个人不得设立病原微生物实验室或者从事病原微生物实验活动。

第四十五条 国家根据对病原微生物的生物安全防护水平，对病原微生物实验室实行分等级管理。从事病原微生物实验活动应当在相应等级的实验室进行。低等级病原微生物实验室不得从事国家病原微生物目录规定应当在高等级病原微生物实验室进行的病原微生物实验活动。

第四十六条 高等级病原微生物实验室从事高致病性或者疑似高致病性病原微生物实验活动，应当经省级以上人民政府卫生健康或者农业农村主管部门批准，并将实验活动情况向批准部门报告。对我国尚未发现或者已经宣布消灭的病原微生物，未经批准不得从事相关实验活动。

第四十七条 病原微生物实验室应当采取措施，加强对实验动物的管理，防止实验动物逃逸，对使用后的实验动物按照国家规定进行无害化处理，实现实验动物可追溯。禁止将使用后的实验动物流入市场。病原微生物实验室应当加强对实验活动废弃物的管理，依法对废水、废气以及其他废弃物进行处置，采取措施防止污染。

第四十八条 病原微生物实验室的设立单位负责实验室的生物安全管理，制定科学、严格的管理制度，定期对有关生物安全规定的落实情况进行检查，对实验室设施、设备、材料等进行检查、维护和更新，确保其符合国家标准。病原微生物实验室设立单位的法定代表人和实验室负责人对实验室的生物安全负责。

第四十九条 病原微生物实验室的设立单位应当建立和完善安全保卫制度，采取安全保卫措施，保障实验室及其病原微生物的安全。国家加强对高等级病原微生物实验室的安全保卫。高等级病原微生物实验室应当接受公安机关等部门有关实验室安全保卫工作的监督指导，严防高致病性病原微生物泄漏、丢失和被盗、被抢。国家建立高等级病原微生物实验室人员进入审核制度。进入高等级病原微生物实验室的人员应当经实验室负责人批准。对可能影响实验室生物安全的，不予批准；对批准进入的，应当采取安全保障措施。

第五十条 病原微生物实验室的设立单位应当制定生物安全事件应急预案，定期组织开展人员培训和应急演练。发生高致病性病原微生物泄漏、丢失和被盗、被抢或者其他生物安全风险的，应当按照应急预案的规定及时采取控制措施，并按照国家规定报告。

第五十一条 病原微生物实验室所在地省级人民政府及其卫生健康主管部门应当加强实验室所在地感染性疾病医疗资源配置，提高感染性疾病医疗救治能力。

第五十二条 企业对涉及病原微生物操作的生产车间的生物安全管理，依照有关病原微生物实验室的规定和其他生物安全管理规范进行。涉及生物毒素、植物有害生物及其他生物因子操作的生物安全实验室的建设和管理，参照有关病原微生物实验室的规定执行。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)



杨玉琴，高级兽医师，硕士研究生导师，现任上海交通大学附属第一人民医院实验动物中心主任，实验动物管理委员会副主任。兼任上海市实验动物生物安全委员会委员，《中国实验动物学报》和《中国比较医学杂志》通讯编委、《实验动物与比较医学》青年编委，入选上海市科委专家库。目前主要研究方向是构建标准化的皮下、原位和转移性人源肿瘤异体移植模型库，同时构建携带病人肿瘤组织和人免疫系统的双人源化小鼠模型，并在此基础上开展肿瘤发病和转移机制及临床药物的筛选评估等研究。发表国内外学术论文20多篇，授权专利2项，并主持和参与多项国家重点基础研究发展计划、科技部、基金委和上海市科委项目。

实验动物屏障设施管理中面临的生物安全问题及对策探讨

杨玉琴

(上海市第一人民医院实验动物中心, 上海 200080)

[摘要] 生物安全是国家安全的重要组成部分，有效控制实验动物生物危害是使用实验动物的基础。本文从实验动物设施管理者的角度，以上海市第一人民医院实验动物中心的生物安全管理经验为基础，分析了目前实验动物屏障设施在保证动物实验顺利开展过程中所面临的潜在生物安全威胁，并探讨了降低此类风险的相关对策，以期为良好控制动物实验中生物安全问题提供借鉴。

[关键词] 实验动物；生物安全；设施管理；问题与对策

[中图分类号] Q95-33；R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0095-07

Biosafety Problems and Countermeasures in the Management of Barrier Facilities for Laboratory Animals

YANG Yuqin

(Department of Laboratory Animal Center, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China)

Correspondence to: YANG Yuqin, E-mail: fudanyan2007@sina.com

[ABSTRACT] Biosafety is an important part of national security, and effective control of biological hazards of laboratory animals is the basis of using laboratory animals. Based on the experience of biosafety management in the Laboratory Animal Center of Shanghai General Hospital, this paper analyzed the potential biosafety threats faced by laboratory animal barrier facilities in the process of ensuring the smooth conducting of animal experiments from the perspective of a laboratory animal facility manager, and discussed the relevant countermeasures to reduce such risks, in order to provide a reference for the proper control of biosafety problems in animal experiments.

[Key words] Laboratory animals; Biosafety; Facility management; Problems and countermeasures

《中华人民共和国生物安全法》明确指出，生物安全是国家安全的重要组成部分，是指有效防范和应对

危险生物因子及相关因素威胁，生物技术能够稳定健康发展，人民生命健康和生态系统相对处于没有危险

[基金项目] 上海市科学技术委员会资助科技计划项目(201409002300)

[作者简介] 杨玉琴(1980—)，女，硕士，主要从事实验动物管理及动物实验研究。E-mail: fudanyan2007@sina.com

和不受威胁的状态,生物领域具备维护国家安全和持续发展的能力。实验动物生物安全是指在生产或使用实验动物过程中,有效防范和控制实验动物或动物实验研究对环境和人类可能产生的潜在风险或现实危害。目前,几乎所有生命科学领域的科研、教学、生产、检定、安全评价和成果评定都离不开动物实验。科学研究中使用实验动物的种类、品种、品系和数量越来越多,实验动物生物安全已引起国内外高度重视。这种生物安全的危险来自实验动物本身所携带的人兽共患病或实验室获得性疾病,这些疾病病原给人和环境带来感染的风险^[1]。Mark等^[2]分析发现,目前已知1145种人类传染病中超过60%为人兽共患病,从1991年至今报告的24种新发传染病中有16种是从动物传播来的,包括2003年暴发的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)和H7N9型禽流感疫情。还有文献^[3]报道,几乎每年都会有一种或两种新发或再现的病原体感染人类并传播,从长远看,这样的发展速度意味着人类将面临着被疾病大肆侵害的危险。

针对实验动物生物安全,我国一直在完善相关的国家标准和法律法规:1994年颁布第一版实验动物国家标准GB 14922.2—1994和GB 14925—1994,其中实验动物分为普通级、清洁级、无特定病原体级和无菌级,实验动物设施分为开放系统、亚屏障系统、屏障系统和隔离系统;2001年第二版的实验动物国家标准GB 14922.2—2001和GB 14925—2001中取消了普通级大小鼠和亚屏障环境;2011年第三版的实验动物国家标准GB 14922.2—2011和GB 14925—2010中对污水、废弃物及动物尸体处理有了较具体的规定;2020年第四版的实验动物国家标准征求意见稿GB 14922.2—2020中取消了清洁级动物分类。2021年4月15日开始实施的《中华人民共和国生物安全法》标志着我国生物安全进入依法治理的新阶段。屏障设施是目前开展动物实验研究中建造和使用数量最多的一种实验动物设施^[4],因此对该类设施中生物安全管理需要进行深入研究探索。2021年罗银珠等^[5]曾探讨了病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用。本文将以上海市第一人民医院实验动物中心的生物安全管理经验为基础,围绕实验动物屏障设施管理中涉及的三个主体即实验动物、人员和环境可能存在的生物安全问题进行分析并提出相应对策,以期为国内同行提供参考。

1 实验动物安全

实验动物是动物设施生物安全防控中最为重要的一环。屏障设施建设和管理的主要目的是在保障动物安全的前提下顺利开展实验,但在动物的引进、饲养和实验中都存在病原微生物感染、繁殖及向环境、人类扩散的风险,从而出现生物安全问题。近年来发生的多起生物安全相关事故即反映了这个问题,如2001年北京某高校因使用不合格动物、动物实验操作不规范而发生鼠源性人兽共患病流行性出血热,致使1名教职人员死亡和700多名师生隔离;2011年黑龙江省某高校的27名学生及1名教师因使用4只未检疫山羊进行实验而感染布鲁氏菌病;2021年北京某设施的一名兽医因感染猴B病毒而死亡^[6-7]。因此加强对实验动物及实验动物设施等各方面的生物安全管理显得尤为重要。

1.1 引进实验动物的安全

引进实验动物是使用实验动物的第一道流程。加强实验动物质量管理,完善动物检验检疫体系,能从源头上避免生物安全事故的发生,并且减少生物安全隐患。实验动物的引进主要有以下几个途径:国外公司和科研院所、国内生产实验动物的公司和科研院所。

1.1.1 来源于国外有资质公司和科研院所的实验动物安全管理

进口实验动物主要是从国外的实验动物公司和科研院所引进。随着实验动物进口数量的增加,输入病原微生物的风险也会逐渐增加。国内首次发现小鼠牛棒状杆菌就是从进口的裸鼠体内分离获得。2010年一批经上海海关进口入境的裸鼠在隔离期间皮肤表面出现了白色鳞片状样物质,短时间内80%的小鼠都出现了相同的症状,经鉴定为牛棒状杆菌。此前该病在日本、美国和意大利的实验动物设施内暴发,是国外实验动物供应商重点监测的裸鼠疫病之一,但在我国尚未有发生该病的动物病例报道^[8],也未将其作为检测项目列入进境动物检疫疫病名录内。因此,2020年1月农业农村部会同海关总署组织发布了新的《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》,里面涉及了很多国内外常见的病原微生物,目前从国外引进的实验动物均按该名录内的项目进行检测,尽量避免新型病原微生物的输入。经过入境口岸隔离检疫后的动物,在进入设施时还应按实验目的及进入的设施区域不同,采取不同的检验检疫方法。我院实验动物中心的经验是:

如后续做动物实验,在进入实验区前需要对动物进行隔离检疫,隔离检疫期间进行一般状态观察和/或病原微生物检测;如后续开展长期的保种繁殖,则在进入繁殖区前还需要完成生物净化。

1.1.2 来源于国内实验动物生产公司的实验动物安全管理

目前,国内实验动物生产公司的动物质量逐年提高,但个别公司由于一些原因也存在动物病原微生物感染的情况。若携带按国标需排除的病原微生物的动物直接进入设施,会给实验动物设施带来较大的生物安全风险^[9-10]。因此,我院实验动物中心对目前国内主要的实验动物生产单位进行筛选,挑选出有资质的可信任供应商,与之建立长期合作关系,以保证实验动物的质量。并根据订购动物的来源不同,采取不同的管理方法。如实验动物来自可靠的供应商且进入实验区做实验前,需对实验动物进行隔离检疫和适应性饲养;在此期间,应对实验动物进行一般状态观察和动物病原微生物的随机抽检。如实验动物来自非可靠供应商,检疫内容主要包括动物一般状态观察和动物病原微生物的每批按比例检测。对于计划开展长期保种繁殖的动物,均需生物净化后方可进入繁殖区。

1.1.3 来源于国内有资质科研院所的实验动物安全管理

目前,国内各科研院所的实验动物设施硬件条件参差不齐,动物病原微生物管控侧重点也不尽相同^[7]。故来源于科研院所的实验动物直接进入设施,潜在风险较大,需要严格控制。我院实验动物中心的要求是:如动物需进入实验区做短期实验,需对每批动物进行隔离检疫及适应性饲养,隔离检疫期间对实验动物进行一般状态观察和按比例病原微生物检测;待实验动物监测合格后,方可从检疫室进入饲养室。进入繁殖区开展长期保种繁殖的动物,先需要完成生物净化。

1.2 动物饲养过程中的安全

规范实验动物的饲养是屏障设施管理的核心,也是实验动物使用的最基本保障。屏障内实验动物的规范饲养应符合国家标准,除硬件设施外,还应有与之相匹配的软件管理体系。2007年广州市某高校实验动物中心发生了实验人员感染肾综合征出血热的事件,其原因就是设施内饲养的大鼠被外源性野鼠感染了出血热病毒^[11]。因此,在设施管理中要保证进入的物品、人员和动物的可控性,不能进入的坚决禁止,同

时做好内部饲养、消毒和检测工作,保证设施的正常运行,降低实验动物感染风险,减少生物安全事故的发生。

1.2.1 饲养相关物品和笼器具的安全管理

进入设施中与饲养相关的物品主要包括水、饲料、垫料和动物笼盒等。如果物品传入管理不当会给整个设施带来严重的污染问题,故相关物品必须保证无菌。目前我院实验动物中心的要求是:饮用水需经反渗透过滤制备或高温高压灭菌,灌装存放有效期不应超过5 d;垫料和动物笼盒必须经过高温高压灭菌后进入;袋装辐照饲料需用消毒水浸泡,确认其外包装的密闭性后,经喷雾结合紫外消毒的方式处理后进入;洁净的笼具在设施内有效存放时间不能超过2周。物品在设施内移动都应保持单向流动:洁物间→清洁走廊→动物饲养室或实验室→污染走廊→缓冲间→清洗间。即从相对洁净的区域流向相对污染的区域,不能反向流动。同时制定严格的清洁消毒制度,清洁消毒需由专人负责,定期检查。定期做好笼盒、水瓶的更换和仪器设备及环境的消毒工作,动物饲养笼盒每1~2周更换一次,饮水瓶按需更换,设施内部每周整体打扫消毒一次;每批动物实验结束后,必须更换该批动物的笼具、水瓶,用消毒液擦拭笼架后,方可开展下一实验;饲养室每3~6个月清空一次,进行整体消毒等。

1.2.2 防范野生动物进入和设施内部动物逃逸的安全管理

野生动物是很多人兽共患病的宿主^[12-13],见表1。屏障设施有非常高的密闭性,但设施外围的野鼠、昆虫数量众多,极可能在设施门开闭时进入,防不胜防。一旦与设施内实验动物接触或污染饲料垫料,极有可能引发生物安全事故。因此,必须做好防虫防鼠的措施。我院实验动物中心采取的措施主要包括以下三点:首先,清除吸引或支持害虫生存的环境因素,加强设施周围的环境治理,垃圾和积水是野生鼠和蚊虫繁殖和生存的重要条件^[14],因此制定了相应的管理制度并及时清理垃圾和积水,搞好外围环境卫生;其次,消除野生动物潜在入口,在设施的各个进出口设置挡鼠板,对进入人员加强随手关门的教育和管理,防止开门时野鼠乘机进入;最后,可以采用器械和药物对野生鼠和蚊虫进行捕抓,如在一定范围内设置诱饵等。

设施内部动物的管理也非常重要。屏障设施是一个动态的系统,空气环境、物品和实验动物都在不断的更新,因此需要加强防护,降低因某间饲养室或某

表1 野生啮齿类动物携带的常见人兽共患病原微生物

Table 1 Common zoonotic protomicroorganisms carried by wild rodents

疾病病原体	病原体类型	人兽共患病	可能携带病原体的动物
肝毛细线虫	寄生虫	是	野生啮齿类动物
棘球绦虫	寄生虫	是	野生啮齿类动物
脑胞内原虫	寄生虫	是	野生啮齿类动物
粗带绦虫	寄生虫	是	普通田鼠
带状绦虫	寄生虫	是	普通田鼠
弓形虫	寄生虫	是	普通田鼠
虫媒病毒	病毒	是	野生啮齿类动物
脑心肌炎病毒	病毒	是	野生啮齿类动物
汉坦病毒	病毒	是	普通田鼠、家鼠以及其他野生啮齿类动物
淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒	病毒	是	普通田鼠
正痘病毒	病毒	是	野生啮齿类动物
副痘病毒	病毒	是	野生啮齿类动物
巴尔通体	细菌	是	普通田鼠
螺旋体	细菌	是	岸鼠、普通田鼠
衣原体	细菌	是	多种野生啮齿动物
伯纳特立克次体	细菌	是	岸鼠、普通田鼠
钩端螺旋体	细菌	是	岸鼠、普通田鼠
鸟型副结核分枝杆菌	细菌	是	黄颈田鼠
立克次体	细菌	是	岸鼠、普通田鼠
金黄色葡萄球菌	细菌	是	野生啮齿类动物

只动物感染造成影响范围和危害程度扩大。在屏障设施内开展各种需要打开笼盒的操作，条件允许时尽量在负压操作台内进行。发现实验动物逃逸，应迅速关闭门，及时进行抓捕。要查明逃逸原因，并制定相关措施，防止实验动物再次逃逸。原则上逃逸动物一律处死，做好相关记录。如因实验需要必须保留此动物，实验人员须给出充足的理由并降级别饲养。

1.2.3 具有潜在风险的特殊品系动物安全管理

基因修饰动物是通过基因工程和克隆技术获得新的实验动物模型。目前，基因修饰动物应用范围非常广泛，数量庞大，但其遗传物质变化带来的风险一般无法在表型上鉴别，可能会对自然环境和人类健康造成潜在的威胁^[15]。尤其是当使用这些实验动物的人员不能确保正确合理的操作和管理，使其逃逸到自然环境中，与同种类动物发生遗传物质的交换和传代，就可能把人类疾病的易感基因转移出去，造成传染病的大流行，破坏生态环境平衡，直接危害人类健康。另外免疫缺陷动物由于免疫功能较低，很容易被环境和人的病原微生物感染，形成病原微生物的放大效应，且该动物主要被应用于细胞和生物样本的接种实验，也易引发生物安全事故^[16]。因此，我院实验动物中心对于这些特殊品系的动物安排独立的房间和饲养人员进行饲养，减少与其他实验动物接触。

1.2.4 设施整体和处理系统的安全管理

影响实验动物健康的因素非常复杂，不同的病原微生物传播途径也不尽相同。一旦设施内部某个环节发生问题，又未及时发现和处理，即会造成重大的污染事故。因此要建立定期对实验动物屏障设施进行监测和优化的管理体系。

我院实验动物中心的监测内容主要包括以下几个方面：设施环境方面，每三个月对设施内部环境、仪器设备表面和进出风口进行病原微生物检测；实验动物方面，饲养人员每日观察，结合兽医每周巡检和每三个月对哨兵鼠进行国家标准以上的病原微生物检测；物品方面，不定期对传入设施内部的饲料、垫料和水进行病原微生物检测。监测到以上任何一方面有问题，都需要从这三个方面进行排查，确定问题原因和范围。如果仅仅是环境或物品出现问题，未影响到实验动物，那么处理相对简单，可以加强消毒并严格管控物品。如果出现患病动物，则需要进一步确定患病动物范围和是否为传染病。如果是个别动物患病，应将异常动物放入隔离室单独饲养，兽医确认患病原因，与项目负责人商议是否治疗或者处死；如需治疗，应详细记录治疗的理由、批准手续、检查情况、药物处方、治疗日期和结果（治疗原则以不影响试验结果为准）；如需处死，则采取安乐死方法，尸体置于冰柜暂存。如

果是整群动物患病,则由兽医人员和项目负责人确诊,不能排除时请兽医专家会诊结合有关单位检测来确定;若诊断为传染性疾病,应立即处死所有患病动物并交给有资质的医疗废物处置机构,按《中华人民共和国动物防疫法》进行无害化处理,同时对整个设施内所有动物进行检查,核查被感染的范围,及时上报当地的实验动物管理和动物防疫监督机构。

1.3 动物实验过程中的安全

能高效开展动物实验且获得有效的实验数据是使用实验动物的根本目的。动物的引进和饲养都是为动物实验开展提供的基础保障。但开展动物实验的过程中涉及到人员、实验物品和动物的相互交叉,如不能有效控制其潜在风险,易引发重大的生物安全事故。

1.3.1 实验项目的安全管理

为了保证动物实验的顺利开展,所有在设施内开展的实验项目均需向该设施所在单位的实验动物伦理委员会提交申请,对该实验项目开展的必要性、实验方法、伦理福利措施及设施是否符合动物实验要求等进行审核。需要强调,屏障设施不能开展涉及病原微生物等的感染类实验。

1.3.2 实验材料的安全管理

实验人员所携带的动物实验材料也是“屏障关”较难控制的方面。我院实验动物中心对实验材料进入屏障的总体管理原则是分类传入:可高压物品必须高温高压处理;不耐高温的物品可以用消毒液喷雾或紫外照射;既不耐高温高压,也不能采用消毒液浸泡处理的物品,可用消毒液熏蒸处理后进入。在外配制的试剂和细胞,需留样抽检。对于难以消毒灭菌的碎冰、手机等,禁止传入;可以在屏障内配置高性能的相机或平板电脑,方便数据的收集。在屏障内外放置低温金属浴,以保障需要在低温保存试剂和细胞的实验的顺利开展。此外,生物材料在实验动物模型制作方面的广泛应用也为实验动物防疫安全提出了挑战。因此,在生物安全管理上尤其要做好各种来源的生物材料安全性检测,防止携带人源或动物源传染性病原的标本用于实验动物。

1.3.3 实验人员操作的安全管理

在医院和高校的动物屏障设施内实验人员人数较多且进出频繁,是屏障环境防疫安全较难控制的因素。实验操作过程中的任何不规范现象,都会对实验结果、动物和环境造成不良的影响。对申请进入设施开展动物实验的人员要进行理论和实践方面的培训,包括设

施使用、动物实验技术和无菌手术操作等,让实验人员严格遵守操作规程,规范化、程序化、标准化地开展动物实验,减少在设施内独立开展实验时发生生物安全事故的概率。同时兽医在屏障设施内巡查时,应对实验人员进行动物实验操作过程中出现的问题进行及时纠错,以保证将人员危险因素降到最低。

1.3.4 实验中取出动物的安全管理

在实验动物屏障设施内开展各种类型的实验,需要的仪器设备也各式各样,但在设施内无法配全所有的仪器设备,因此就会出现有一部分实验需要将动物取出设施,在设施外完成实验。但取出后动物是不能再返回屏障设施内的,因此很多单位都会在屏障外设置一个暂养区^[17]。在该区域可以短期内继续进行实验观察,把潜在的风险排除在屏障设施之外,避免屏障内其他动物受到影响。

暂养区作为屏障设施外的一个有效的补充区域,不仅降低了取出的实验动物在屏障设施外实验区域发生安全事故概率,也保障了实验的顺利开展;但放置在暂养区的动物因为均在外部暴露过,被感染的概率非常高,因此需对暂养区房间及动物加强管理。我院实验动物中心目前主要在设施条件、动物饲养和取出动物返还等方面加强了管理。暂养区的内部设有独立通气笼盒和负压换笼工作站,饲养、消毒管理与屏障系统一致;饲养在暂养区的动物不允许繁殖,且饲养时间不能超过2个月;同时设置哨兵鼠对该区域内动物的病原微生物进行监测。

凡允许返回到暂养区的实验动物需满足以下几点:(1)实验动物移至屏障环境外的实验室,必须通过单位实验动物伦理委员会的审查;(2)实验人员在运输该批实验动物时,选择了合适的运输工具和运输方式,并保证了动物的生物安全且符合伦理要求;(3)该批实验动物在区域外未与其他不明来源的动物接触,未接触可能存在污染风险的仪器设备;(4)返还的实验动物规格(品系、数量、周龄等)须和取出的实验动物一致,如有数量的变化需标明及记录。兽医将对返回的实验动物按国家标准进行定期抽检。

2 实验和饲养人员安全

目前,在屏障设施的生物安全管理过程中,人们关注点大多集中在动物的安全上,而对于实验和饲养人员的人身健康及生命安全的关注较少^[18]。由于实验或饲养人员会与实验动物及排泄物直接接触,所以一

旦发生人兽共患病或操作意外,即可能造成较严重的后果。因此,必须加强对实验和饲养人员的生物安全防护工作。

2.1 安全防护设备的配备

屏障系统内必须配备安全防护设备。安全防护设备可分为个人防护设备(personal protective equipment, PPE)和生物安全柜(biosafety cabinet, BSC)^[19]。PPE是对实验和饲养人员的重要保护屏障。因此进入设施应正确穿戴防护装备,如手套、口罩、鞋套、隔离服等。实验人员手上有皮肤破损或皮疹时应戴双层手套;实验人员进行动物抓取操作不熟练时,需佩戴防咬手套;针对可能发生的实验动物咬伤或抓伤,手术器械如手术针、手术刀、手术剪、注射器等锐器刺伤等伤害事件,设施内需要配备利器盒,设施外需配备医疗急救箱等,以提高整体防护等级,保护实验人员安全。

在实验动物饲养和实验开展过程中有很多操作可能产生气溶胶^[6],尤其在笼盒更换、动物实验解剖、脏垫料处理过程中,实验或饲养人员会直接接触动物及其排泄物,如果实验动物患有人兽共患病,其产生的大量的微生物气溶胶会对相关人员造成危害。BSC是目前最常用且最有效的实验室生物安全防护设施,它可以将传染性气溶胶限制在一定空间内,使其不会扩散出去危害操作者。因此在我院实验动物设施内各个操作间配备相应的负压的换笼工作站、生物安全柜,在设施外放置了负压垫料处理柜,以上措施可有效减少气溶胶导致的人员生物安全事故的发生。

2.2 安全培训体系的建立

为了确保人员安全,实验动物设施的管理者需建立一套知识面广、内容细致且可行性强的课程体系,包括人员个人防护、实验动物技术操作和仪器使用操作规范等,通过培训不断加强饲养及实验人员的自我保护意识^[20]。内容可包括但不限于:根据实验动物设施生物安全个人防护的配备原则,穿着合适的PPE;规范实验动物技术操作,加强熟练性训练,逐步掌握正确的防护措施,从而有效避免针刺伤、锐器伤和动物咬伤等伤害事件;正确使用设施内的各种仪器设备,加大仪器标准操作的宣传力度,以充分发挥设备的防护作用。例如,可将实验动物相关安全概念及危害等做成展板海报,贴在实验动物设施的宣传栏内。

3 环境安全

在实验动物设施运行过程中,主要产生固体、液

体和气体三种形式废弃物^[21],如果按照普通生活垃圾处理,将固体废弃物随意丢弃,液体废弃物直接排入下水管道,气体废弃物直接排放到周围大气中,不仅污染环境,还增加传染性疾病传播的概率,给人类日常生活带来巨大的威胁。因此,应对实验动物废弃物进行分类收集,通过相应设备进行处理后排放或者交由有资质单位进行无害化处理。

3.1 液体废弃物的排放

液体废弃物主要是由清洗动物笼具及各种实验用品产生的大量含有实验动物排泄物的污水^[22]。感染性动物因含有大量的病原菌,其废水不宜直接排放,要先经消毒处理;非感染性动物废水可不进行消毒,但所有废水的氨氮和其他指标需达到相应的国家和地方标准后方可排入市政污水管网。

3.2 气体废弃物的排放

气体废弃物主要是由动物粪尿发酵分解产生的具有特殊气味的有害气体,主要含有氨、氯、硫化氢和硫醇等。废气未经有效处理就直接排放,会对周边环境造成很大程度的污染,需要在设施的排风系统末端连接除臭设备,经过滤除臭,达到相应的国家和地方标准后再进行排放。

3.3 固体废弃物的排放

固体废弃物主要是实验产生的废化学试剂、动物粪便混合的饲料、垫料、动物尸体及更换的各类过滤器,均应作为医疗废弃物,委托当地的固体废物处置中心或有资质的公司进行专业处理^[23]。

4 结语

21世纪以来,全球范围内发生的公共卫生事件中,人兽共患病所占的比例不断增加^[24]。人类、动物和环境的联系越来越紧密,“同一健康(One Health)”理念应运而生。这一理念注重人类、动物和环境健康间的关联性,强调跨学科、跨部门、跨区域的合作,重视环境在疫病传播过程中的作用,旨在实现人类、动物和环境的整体健康^[25]。屏障系统作为目前我国建造和使用数量最多的实验动物设施,对其涉及的动物、人员和环境的生物安全风险进行有效的分析评估,并建立其相应的生物安全防范措施,才能实现安全管理,保障动物相关教学、科研有条不紊地进行。希望笔者的探索和尝试可为其他实验动物屏障系统的生物安全管理提供参考和借鉴。

[利益声明] 作者声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李秀, 黎宁, 杨寿清, 等. 屏障系统内实验动物饲养管理中的生物安全、动物福利与伦理[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2013(5):46-47. DOI:10.3969/j.issn.1000-7725.2013.05.024.
- [2] WOOLHOUSE M E J, GOWTAGE-SEQUERIA S. Host range and emerging and reemerging pathogens[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(12):1842-1847. DOI:10.3201/eid1112.050997.
- [3] CUNNINGHAM A A, DASZAK P, WOOD J L N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2017, 372 (1725):20160167. DOI:10.1098/rstb.2016.0167.
- [4] 王锡乐, 巩薇, 贺争鸣, 等. 中国大陆地区实验动物使用现状分析[J]. 实验动物科学, 2017, 34(6):42-48, 54. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2017.06.010.
- [5] 罗银珠, 闵凡贵, 王静, 等. 病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5):443-449. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.219.
- [6] 马春峰, 郭振东, 汤文庭. 动物生物安全实验室常见生物危害及控制措施[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(9):119-124.
- [7] WANG W L, QI W J, LIU J Y, et al. First human infection case of monkey B virus identified in China, 2021[J]. China CDC Wkly, 2021, 3(29):632-633. DOI:10.46234/ccdcw2021.154.
- [8] 张强, 熊炜, 李健, 等. 裸鼠过度角化症牛棒状杆菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(8):581-584. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.2011.08.01.
- [9] 杨国淋, 李阳友, 苏畅, 等. 实验动物屏障系统建设与管理探讨[J]. 现代农业科技, 2017(16):236-237, 241. DOI:10.3969/j.issn.1007-5739.2017.16.142.
- [10] 李春秋, 孙艺洋, 王景伟, 等. 高校实验动物生物安全管理与建设[J]. 特种经济动植物, 2020, 23(11):8-12.
- [11] 董智强, 罗雷, 王玉林, 等. 广州市某高校动物实验室生物安全事件的调查与分析[J]. 医学动物防制, 2010, 26(1):14-15, 18.
- [12] 李凯航, 杨显超, 吴秀娟, 等. 三种人畜共患病在多种动物中的血清学调查[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2018(1):29-31. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2018.01.011.
- [13] TRIMMEL N E, WALZER C. Infectious wildlife diseases in Austria-A literature review from 1980 until 2017[J]. Front Vet Sci, 2020, 7:3. DOI:10.3389/fvets.2020.00003.
- [14] 汪诚信. 实验动物饲养场所的害鼠治理[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007(2):85-88.
- [15] XU J X, LI N. Biosafety assessment of genetically engineered animals: a review[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2012, 28(3):267-281.
- [16] CHOI S A, YUN J W, JOO K M, et al. Preclinical biosafety evaluation of genetically modified human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for clinical applications to brainstem glioma[J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(12):897-908. DOI:10.1089/scd.2015.0324.
- [17] 谢忠忱, 江轶, 黄开胜, 等. 高校实验动物生物安全管理模式研究[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2):1-5. DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.
- [18] 马小琴, 徐望娴. 实验动物从业人员职业危害及其防护研究进展[J]. 中国职业医学, 2014, 12(6):735-738. DOI:10.11763/j.issn.2095-2619.2014.06.028.
- [19] 罗琴, 范才文. 高校动物实验的安全与防护[J]. 华夏医学, 2019, 32(2):163-165. DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2019-02-051.
- [20] 刘厚茹, 徐铭. 浅谈医学院校动物实验室生物安全管理与防范[J]. 甘肃畜牧兽医, 2021, 51(07):18-21.
- [21] 李鹏辉, 张宗兴, 徐新喜. 生物安全实验室初级防护设备和废弃物处理设备现状及发展建议[J]. 医疗卫生装备, 2021, 42(5):59-65. DOI:10.19745/j.1003-8868.2021100.
- [22] 李润林, 董鹏程, 陈靖, 等. 实验动物废弃物无害化处理的现状和对策[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(6):85-88. DOI:10.13823/j.cnki.jtcvm.2020.06.021.
- [23] 张晶, 代明, 黄智翔, 等. 动物生物安全实验室生物废弃物安全处置管理与探索[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(8):280-283, 288. DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.08.062.
- [24] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC report on the potential exposure to Anthrax[J]. Int Microbiol, 2014, 17(2):119-127. DOI:10.2436/20.1501.01.214.
- [25] GIBBS E P J. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future[J]. Vet Rec, 2014, 174 (4):85-91. DOI:10.1136/vr.g143.

(收稿日期:2021-10-25 修回日期:2021-12-10)

(本文编辑:张俊彦,郭嘉欣)

关于本刊论文格式的新要求

从2022年第3期起,为实现中文期刊的国内外科技交流目标,本刊对论文格式新增要求如下:

1、通讯作者需提供科研人员唯一学术标识,即开放研究者与贡献者身份识别码(Open Researcher and Contributor ID, ORCID);

2、研究报告类型的论著文章中,图表的标题和注解请中英文对照表达,图表内容则请全英文呈现。

3、文后参考文献若来源于中文,请同时提供其相应的英文,均列在同一序号之下。

(《实验动物与比较医学》编辑部)



陈洪岩, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所二级研究员、博士生导师, 实验动物与比较医学创新团队首席、国家禽类实验动物资源库主任、哈尔滨兽医研究所兽药评价中心主任。兼任黑龙江省实验动物专业标准化技术委员会主任, 黑龙江省实验动物学会理事长, 农业农村部兽用生物制品GMP、GCP检查员。主持各类课题近百项, 发表学术论文百余篇, 主编、副主编著作9部, 授权专利12项、标准16项、软件著作权2项。获得省科技进步二、三等奖各2项。培育出具有独立知识产权的中国SPF鸡、鸭、猪资源, 在重大动物疫病如禽流感、非洲猪瘟等防控研究中发挥重要作用; 研制出实验室生物安全及实验动物相关设备近20种; 牵头制定的实验动物地方法规通过省人大立法。目前主要从事实验动物与比较医学研究, 以及兽药GMP、GCP研究, 承担国家重点研发计划项目“畜禽疫病防控专用实验动物开发”“生物安全型IVC的研发”“生物安全型换笼工作台的研发”等课题, 以及省自然科学基金重点项目“SPF鸭种质资源创新与新品种选育”等研究工作。

自主研发生物安全型换笼工作台的性能检测与评价

苏世博, 马文杰, 王伟, 郭慧娟, 张贺, 王梓, 康雷, 刘守琦, 刘怀然, 司昌德, 苟春天, 张伟, 陈洪岩

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 国家禽类实验动物资源库, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 150069)

[摘要] **目的** 对自主研发的生物安全型换笼工作台进行功能检测与安全性评价。**方法** 依据YY 0569—2011《Ⅱ级生物安全柜》、RB/T 199—2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》等标准对自主研发的由深圳泓腾生物科技有限公司生产的生物安全型换笼工作台(HT-1303)的各项性能指标进行检测, 并判定其有效性及安全性。**结果** 换笼工作台的主体外观完整性和稳定性、工作区洁净度、流入气流流速、下降气流流速、照度、噪声、气流流向、高效过滤器等检测效果良好, 达到Ⅱ级生物安全柜标准。污染物品回收舱及器物表面灭菌舱的气密性效果良好, 其尺寸、灭菌笼盒数量等还需进一步改进。**结论** 本团队研制的生物安全型换笼工作台可实现整机正常运行, 其各项指标合格, 能够完成负压环境下独立通风笼具的更换, 并保证操作者、实验对象及环境的安全。

[关键词] 换笼工作台; 性能检测; 生物安全

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0102-09

Performance Test and Evaluation of Self-developed Biosafety Cage Changing Workbench

SU Shibo, MA Wenjie, WANG Wei, GUO Huijuan, ZHANG He, WANG Zi, KANG Lei, LIU Shouqi, LIU Huairan, SI Changde, GOU Chuntian, ZHANG Wei, CHEN Hongyan

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, National Poultry Laboratory Animal Resource Center, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150069, China)

Correspondence to: CHEN Hongyan, E-mail: chenhongyan@caas.cn

[ABSTRACT] **Objective** To test the function and evaluate the safety of the self-developed biosafety cage changing workbench. **Methods** According to the criteria of YY 0569-2011 "Class II Biological Safety Cabinet"

[基金项目] 国家重点研发计划项目: BSL-4实验室IVC笼盒更换工作台的研制及应用(2018YFC1200301);手套箱式生物隔离器和感染动物隔离设备的研发(2016YFC1201401)

[作者简介] 苏世博(1996—),男,硕士研究生,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail:270141601@qq.com

[通信作者] 陈洪岩(1963—),男,研究员,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail:chenhongyan@caas.cn

and RB/T 199-2015 "Laboratory Equipment Biosafety Performance Evaluation Technical Specifications", we detected the various performance indicators of the cage changing workbench (HT-1303), which was independently developed and produced by Shenzhen Hongteng Biological Technology Co., LTD, and evaluated the safety and validity. **Results** The appearance integrity and stability of the main body of the biosafety cage changing workbench, the cleanliness of the working area, the velocity of the inflow airflow, the velocity of the descending airflow, the illuminance, the noise level, the airflow direction, the high-efficiency particulate air filter were at good condition, reaching the standards of level II biological safety cabinet. The airtightness of the contaminated goods recovery cabin and the sterilization chamber of utensil surface was good, but the size and quantity of the sterilized cage box need to be further improved.

Conclusion The biosafety cage changing workbench developed by our team can be operated properly in whole. It can complete the replacement of individually ventilated cages in this workbench under negative pressure environment. Our workbench also can ensure the safety of operators, environment and experimental subjects.

[Key words] Biosafety cage changing workbench; Performance test; Biosafety

近年来, 新型冠状病毒肺炎、非洲猪瘟等新发突发传染病不断暴发, 对人类和动物健康造成了严重的威胁。生物安全实验室是探索病原微生物的致病性、免疫机制, 以及开发药物和疫苗等的重要场所, 它通过配备实验室设施设备、个人防护装备等屏障, 并建立良好的操作规程和严格的管理措施控制生物危害, 实现保护实验人员和环境, 防止病原微生物造成危害性污染的目标^[1]。生物安全作为国家总体安全的重要组成部分, 事关人类健康、公共卫生安全、国家经济和社会稳定^[2]。自2020年10月起, 我国通过并实施《中华人民共和国生物安全法》, 从法律层面构筑了国家生物安全防线^[3]; 出台了一系列关于“加强病原微生物实验室生物安全管理”的规定, 其中重点强调科研人员在操作病原微生物及进行动物实验时要避免微生物、实验动物对人和环境造成污染, 同时避免不同分组的实验动物之间相互污染以保证动物实验结果的准确性和可靠性^[4]。

在生物安全实验室进行小鼠实验时通常需要使用负压独立通风笼具 (individually ventilated cages, IVC)。为了维持IVC笼盒内小环境稳定, 定期更换笼盒是重要手段。为了避免笼盒内可能存在的致病性微生物导致换笼操作过程中发生微生物外泄、交叉感染等一系列问题, 研究人员专门为更换IVC笼盒设计出一种特殊的II级生物安全柜, 即生物安全型换笼工作台 (以下简称换笼台)。它能够防止操作处理过程中含有危险性或未知生物微粒的气溶胶散逸对操作者和环境造成危害, 具有生物安全柜和换笼台的双重功用。目前, 换笼台代表产品有意大利Tecniplast公司的BS60、BS48型和美国Allentown公司的SC4、SC6型。

Tecniplast公司的BS60型拓展产品即IBS型兼具II级生物安全柜和换笼两种功能; 换笼台台体符合II级生物安全柜的要求, 可保护动物、环境及人员不受污染; 两边设有独立的外挂设备, 一侧是采用双门转移切换装置 (double porte transfer exchange, DPTE) 与台体连接的高压灭菌传递舱, 能够对污染物料及更换下的笼盒进行高压灭菌, 另一侧则配备一个液体浸泡池, 对完成换笼待传回隔离笼架的笼盒外表面进行消毒。

针对我国高等级生物安全实验室的需求, 本团队自主研发了一种新的生物安全型换笼工作台, 以作为保障实验环境和操作者的第一道屏障。自主研发的换笼台结构也分为三个部分: 第一部分是II级生物安全柜, 作为换笼操作的工作区域; 第二部分是左侧的外挂设备, 通过DPTE连接的污染物品回收舱, 用于传递更换下来的污染物品及笼盒, 转运至高压灭菌器处理; 第三部分是右侧设置配套的更换后笼盒外表面灭菌装置, 以及通过气密门与换笼台台体连接的器物表面灭菌舱。本研究对该换笼台进行性能测试与安全性评价, 包括换笼台的主体性能、污染物品回收舱与器物表面灭菌舱的气密性测试、换笼台实际使用操作等, 具体报告如下。

1 设备与方法

1.1 换笼台结构概述

自主研发的生物安全型换笼台由台体、工作区域、通风过滤系统、监控系统、传递系统、支撑系统和消毒系统组成 (图1)。

台体部分是操作IVC笼盒的空间 (即工作区), 由外壳和内壳围成长方体, 污染部位处于负压状态或被

负压区包围,具备Ⅱ级A2型生物安全柜的功能。

工作区顶部为送风高效过滤器。箱体前部的前面板是一个可升降的前窗操作口。通风过滤系统由驱动风机、风道、循环空气过滤器和外排空气过滤器组成。

当换笼台的驱动风机启动以后,外界气体从前窗操作口周边及操作者的周围向内吸入进风格栅,在换笼台工作区内形成一定的负压;经高效空气过滤器过滤的洁净空气从顶部垂直向下流经工作区;下降气流沿前壁引入到换笼台的前窗操作口处,并流入进风格栅,形成一道特殊的垂直气幕;进入进风格栅的气流与工作区下降气流一起通过密封风道进入气室,一部分由送风高效空气过滤器过滤后再进入工作区,另一部分经过排风高效空气过滤器过滤后通过排风管道排至大气中。换笼台排风道安装有互锁系统,防止排风流量不足时,换笼台风机继续工作,使换笼台产生正压,导致工作区域的气流外溢至实验室。

监控系统主要由可编程逻辑控制器(programmable logic controller, PLC)控制模块、显示屏、压差传感器、密闭阀执行器、变频器、照明、温湿度传感器、报警模块、开关、电源等组成,可控制排风机的启停、密闭阀开关、压差、温度、照明、报警等。联锁报警主要有前窗操作口报警、供/排风机联锁报警、气流显示与报警器、设置室外排风机联动

报警。

传递系统包括更换后IVC笼盒的外表面灭菌装置即器物表面灭菌舱(即笼盒传递舱)和无泄漏传递、处理污染物品的高压灭菌传递舱。换笼台台体的一侧设置更换后IVC笼盒的外表面灭菌装置,该装置为密闭灭菌舱,与换笼台主体通过气密门连接,设置有压力测试孔,气密性符合YY 0569—2011标准中Ⅲ级生物安全柜要求。灭菌方法采用气(汽)体熏蒸法,避免消毒剂残留对IVC笼盒内的实验动物构成伤害。在换笼台上设定更换好的笼盒传递循环、灭菌时间和程序,并对过程进行控制,保证灭菌效果和IVC笼盒内实验动物不缺氧。换笼台台体的另一侧设置DPTE,连接污染物品回收舱,即脏笼盒收集桶(或高压灭菌袋),在无泄漏的条件下传递更换下来的IVC笼盒、动物饮水瓶、脏垫料等污染物品及材料,通过DPTE转移至污染物品回收舱,再转运至高压灭菌器进行灭菌处理。污染物品回收舱上设置有安全排气阀。

支撑系统包括分别支撑台体核心部分、器物表面灭菌舱、高压灭菌传递舱的可调节支撑脚及脚轮。

1.2 主要检测设备及条件

主要检测设备包括德国 testo 540 照度计(精度 $\pm 3\%$)、芬兰 vaisala HM41 手持式温湿度计($\pm 1.5\%$ RH、 $\pm 0.2^\circ\text{C}$)、中国 数字声级计 TES-1350A、美国



图1 自主研发生物安全型小鼠IVC换笼台的平面示意图

Figure1 Schematic diagram of self-developed biosafety mouse IVC cage changing workbench

Lighthouse HANDHELD 3016 手持式激光粒子/尘埃粒子计数器 (精度 10%)、法国 KIMO VT110 便携式风速仪 (精确度: ± 0.05 m/s)、美国 ATI 气溶胶光度计 TDA-2i (精确度: 读数值 0.01%)、美国 TSI 雾化气溶胶发生器 3079、上海捷豹无油静音空压机 (2530) 750-29L (额定排气压力 0.7 MPa), 这些设备均为黑龙江省实验动物质量监督检验站所有, 均经过检定校准, 有效期为 2020 年 8 月—2021 年 8 月。检测人员为黑龙江省实验动物质量监督检验站检测员和团队科研人员, 专业技术能力合格。检测对象为本团队自主研发的换笼台 1、2、3, 以及某国外换笼台产品及某进口 Thermo Scientific 1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜 (作为对照)。

1.3 检测内容及方法

1.3.1 换笼台安装和运行环境检测

依据 GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》、GB 50447—2008《实验动物设施建筑技术规范》、GB 19489—2008《实验室生物安全通用要求》、GB 50346—2011《生物安全实验室建筑技术规范》标准检测换笼台安装和运行环境。

1.3.2 换笼台主体与 II 级 A2 型生物安全柜性能检测

依据 YY 0569—2011《II 级生物安全柜》、RB/T 199—2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》、JG 170—2005《生物安全柜》、GB 50346—2011《生物安全实验室建筑技术规范》、RB/T 010—2019《实验动物屏障和隔离装置评价通用要求》, 对换笼台及 II 级 A2 生物安全柜的性能指标进行现场检测。

1.3.2.1 外观完整性与稳定性检测

根据 YY 0569—2011 标准, 观察自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体、生物安全柜的柜体表面有无明显划伤、压痕及锈斑, 表面是否光滑洁净, 设备外观是否规矩平整; 具有说明功能的文字、符号等标记是否表述清晰正确, 且安装是否端正、牢固; 查看柜体焊接部位是否牢固, 焊接表面是否光滑; 可移动窗开启与关闭是否顺畅, 是否产生卡死现象, 是否有明显晃动; 报警和联锁系统是否正常; 在最容易倾倒的方向倾斜 10° 时, 换笼台是否倾倒; 换笼台照明灯和风机工作持续运行 4 h, 检测工作区中心温度; 自主研发的换笼台器物表面灭菌舱舱门和污染物品回收舱舱门操作是否顺畅。

1.3.2.2 密封性检测

根据 YY 0569—2011 标准, 通过肥皂泡法检测自

主研发的换笼台和某国外换笼台的台体以及生物安全柜柜体的气密性。配制 25 g/L 的软肥皂泡水。关闭台体和安全柜的前门, 并用密封胶条封好, 使台体和柜体成为密封系统。向台体和柜体中加压至 500 Pa, 将肥皂水均匀涂抹于压力通风系统的外表面的所有焊接处、密封处、气密门、和封口处, 检测是否产生气泡及气泡破裂的声音, 即在此压力条件下是否有肥皂泡反应。

1.3.2.3 工作区洁净度检测

采用 JG 170—2005 标准中洁净度的检测方法。自主研发的换笼台、某国外换笼台产品以及生物安全柜先正常运行 30 min, 检测人员用手持式激光粒子/尘埃粒子计数器在距离操作工作窗内 100 mm 且工作台面上 200 mm 高度处进行检测。按照双对角线四角和中心点共布置 5 个采样点, 采样完毕后对手持式激光粒子/尘埃粒子计数器进行自净。

1.3.2.4 高效滤器检测

采用 YY 0569—2011 标准中高效过滤器的检测方法。首先运行自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体主机、安全柜的风机及照明灯与紫外灯, 安放气溶胶发生器, 将气溶胶导入台体和柜体, 产生均匀分布的高效过滤器上游气流。然后打开气溶胶光度计, 光度计探头在过滤器下游距过滤器表面 20 mm, 以 40 mm/s 的扫描速度移动, 检测高效过滤器的过滤效率, 即氢化聚癸烯 (PAO) 气溶胶的泄漏量。

1.3.2.5 流入气流流速检测

采用 YY 0569—2011 标准中流入气流流速的检测方法。首先升高自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体、生物安全柜工作窗口至日常工作高度, 然后使用便携式风速仪在前窗操作口平面两个高度处进行检测。第一个高度是距离操作口上沿下方约日常工作高度 1/4 的位置; 第二个高度是距离操作口下沿上方约日常工作高度 1/4 的位置。每个测量点的水平距离为 100 mm, 距前窗侧边 > 100 mm, 用所有测量值的平均值表示流入气流流速。

1.3.2.6 下降气流流速检测

采用 YY 0569—2011 标准中下降气流流速的检测方法。首先在自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体、生物安全柜工作区域上方, 使用便携式风速仪进行检测。检测的水平面高于前窗操作口上沿 100 mm 处, 布置至少 3 排测量点, 每排最少 7 个, 等距分布, 间距不大于 150 mm。最外侧的测量点距离安

全柜内壁和前窗操作口 150 mm 远, 求取平均值。

1.3.2.7 噪声与照度检测

采用 YY 0569—2011 标准中噪声与照度的检测方法。首先打开风机和照明灯, 在自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体、生物安全柜前方中心的外侧 300 mm 处, 使用数字声级计进行检测, 检测高度为高于工作台面 380 mm 处。然后关闭风机和照明灯, 在原先的检测点对背景噪声进行检测。若背景值 > 57 dB 需修正, 安全柜的噪声结果不应超过 67 dB。

照度检测位置位于工作台面内侧壁中心连线处, 检测点间隔距离 < 300 mm, 最外侧检测点距离侧壁应 > 150 mm。首先关掉安全柜灯, 测量背景照度值, 平均背景照度应为 (110 ± 50) lx。然后打开灯, 启动风机, 从一侧起依次在测量点测量照度, 安全柜平均照度应 ≥ 650 lx, 每个照度实测值应 ≥ 430 lx。

1.3.2.8 气流模式检测

采用 YY 0569—2011 标准中气流烟雾模式的检测方法。采用气溶胶发生器沿着自主研发的换笼台、某国外换笼台产品以及生物安全柜工作台面的中心线在前窗操作口顶端以上 100 mm 的高度, 从安全柜的一端到另一端检测下降气流。烟雾在观察窗后 25 mm、前窗操作口顶端以上 150 mm 高度, 从安全柜的一端到另一端检测观察窗气流。烟雾在安全柜外约 38 mm 处, 沿着整个前窗操作口的周边经过, 进行前窗操作口边缘气流测试。烟雾在滑动窗内, 从距安全柜侧壁和工作区顶部 50 mm 处经过, 检测活动窗密闭性。

1.3.3 污染物品回收舱气密性检测

采用 YY 0569—2011 标准中肥皂泡法检测自主研发的污染物品回收舱的气密性。配制 25 g/L 的软肥皂泡水。关闭收集桶的门, 封好呼吸阀排气孔, 使收集桶成为密封系统。通过呼吸阀使用气泵向灭菌设备中打压至 500 Pa 后, 将肥皂水均匀涂抹于传递舱表面、DPTE 门缝隙及外表面, 用肉眼观察是否产生气泡及气泡破裂的声音。

1.3.4 器物表面灭菌舱气密性检测

使用 YY 0569—2011 标准中肥皂泡法检测自主研发的换笼台器物表面灭菌舱的气密性。配制 25 g/L 的软肥皂泡水。向消毒设备打压至 500 Pa, 将肥皂水均匀涂抹于器物表面灭菌舱舱体及正面门和左侧连接换笼台主体门缝隙及外表面, 检测是否产生气泡及气泡破裂的声音。

1.3.5 换笼台实操预评价

在 ABSL-2 啮齿动物实验设施负压屏障环境中, 在

规定参数条件下对自主研发的换笼台进行换笼操作, 以评价换笼台的可操作性。更换程序: 新笼盒和动物饮水瓶等先放入换笼台操作区, 经紫外灯照射和表面灭菌; 将实验笼盒拿入换笼台操作区, 将小鼠转至新笼盒; 将换好的笼盒放入器物表面灭菌舱, 开启 H_2O_2 灭菌程序; 灭菌程序完毕后, 取出笼盒, 将换好的笼盒放入 IVC 笼架; 消毒程序运行时, 将脏笼盒传入污染物品回收舱, 转运至高压灭菌器灭菌, 高压灭菌后清洗笼盒。

1.4 测试结果的统计分析

采用 Excel 软件进行统计学处理, 每台设备重复检测 3 次, 结果数据用平均值表示。

2 结果

2.1 换笼台工作环境

依据相关标准对 ABSL-2 啮齿动物实验设施负压屏障环境进行了检测, 温度为 24 °C, 相对湿度为 50%, 换气次数为 15 次/h, 压强梯度为 -15 Pa, 空气洁净度为 7 级, 照度为 341 lx, 噪声为 24 dB (A), 表明环境符合相关标准。

2.2 换笼台主体性能

2.2.1 外观与稳定性

对自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体、生物安全柜进行检测后发现, 换笼台台体与生物安全柜外观规矩平整, 无明显锈斑及损伤痕迹; 具有说明功能的文字、图形符号等标记指向清晰, 描述正确, 安装端正且牢固; 台体和柜体焊接部位牢固, 焊接表面手感光滑且无松散感; 台体和柜体移动窗的开启与关闭轻便、顺畅, 无明显的晃动或卡死现象; 声音报警、声光报警和联锁系统正常; 在最容易倾倒的方向倾斜 10° 时, 不倾倒; 换笼台与安全柜的照明灯和风机持续运行 4 h, 工作区中心温度小于环境温度。自主研发的换笼台器物表面灭菌舱舱门、污染物品回收舱舱门操作顺畅。

2.2.2 密封性

使用肥皂泡法检测自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体、生物安全柜的密封性, 密封台体加压到 500 Pa, 保持气压在 500 Pa 左右, 换笼台台体表面、焊接处、密封处、气密门、DPTE、封口处等没有产生气泡及气泡破裂的声音, 生物安全柜焊缝、衬垫、封口处等也没有产生气泡及气泡破裂的声音, 证明换笼台台体与生物安全柜的气密性良好。

2.2.3 洁净度

根据JG 170标准中洁净度的检测方法检测换笼台台体、生物安全柜工作区双对角线四角和中心点共5个采样点的尘埃粒子数,结果显示自主研发的3台换笼台和某国外换笼台产品、生物安全柜工作区的洁净度符合100级(标准5级)要求。具体的漏过尘埃粒子数据见表1。

2.2.4 高效过滤器漏过率

采用YY 0569—2011标准中高效过滤器的检测方法。首先运行自主研发的换笼台和某国外换笼台产品的台体主机、安全柜的风机及照明灯与紫外灯,安放气溶胶发生器,将气溶胶导入台体和柜体,产生均匀分布的高效过滤器上游气流。然后打开气溶胶光度计,光度计探头在过滤器下游距过滤器表面20 mm,以40 mm/s的扫描速度移动,检测高效过滤器的过滤效率,即PAO气溶胶的泄漏量,结果显示自主研发的3

台换笼台和某国外换笼台、生物安全柜的高效过滤器漏过率均符合标准。具体的检漏气溶胶结果见表2。

2.2.5 气流速度

根据YY 0569—2011标准中流入气流流速、下降气流流速的检测方法,使用便携式风速仪在自主研发换笼台与国外换笼台台体、生物安全柜的前窗操作口平面两个高度处检测流入气流;另外每台设备布置至少3排测量点,检测下降气流,检测结果如表3所示。检测结果均符合Ⅱ级生物安全柜要求。

2.2.6 照度和噪声值

根据YY 0569—2011标准中噪声与照度的检测方法,检测结果如表4所示。其中噪声值与背景噪声值均相差10 dB以上,提示噪声值为可靠数据。自主研发的换笼台噪声均小于67 dB,照度均不小于650 lx。自主研发的3台换笼台和某国外换笼台、生物安全柜照度和噪声均符合标准要求。

表1 自主研发换笼台和某国外换笼台、生物安全柜的漏过尘埃粒子数比较

Table 1 Number of particles missed of self-developed cage changer and some foreign cage changer and biosafety cabinet

检测项目	换笼台1	换笼台2	换笼台3	国外换笼台	安全柜
尘埃粒子浓度/(10 ³ 粒·L ⁻¹)	51.55	51.70	51.56	51.69	51.39
尘埃粒子漏过量/(粒·L ⁻¹)	0.33	0.67	0.67	0.67	0.60

注:换笼台1、2、3为自主研发的国产设备,国外换笼台为国外某品牌产品,安全柜为某品牌Ⅱ级A2型生物安全柜,表中数据为每台设备检测3次的平均值。

表2 自主研发换笼台和某国外换笼台、生物安全柜的高效过滤器检漏气溶胶比较

Table 2 High efficiency filter leak detection of self-developed cage changer and some foreign cage changer and biosafety cabinet

检测项目	换笼台1	换笼台2	换笼台3	国外换笼台	安全柜
气溶胶浓度/(μg·L ⁻¹)	21.67	21.77	21.97	22.03	21.51
气溶胶漏过率/‰	0.08	0.07	0.07	0.07	0.10

注:换笼台1、2、3为自主研发的国产设备,国外换笼台为国外某品牌产品,安全柜为某品牌Ⅱ级A2型生物安全柜,表中数据为每台设备检测3次的平均值。

表3 自主研发换笼台和某国外换笼台、生物安全柜的气流速度比较

Table 3 Gas flow rate of self-developed cage changer and some foreign cage changer and biosafety cabinet

检测项目	换笼台1	换笼台2	换笼台3	国外换笼台	安全柜
流入气流1	0.87	0.86	0.89	0.90	0.74
流入气流2	0.56	0.56	0.55	0.55	0.45
下降气流1	0.33	0.33	0.33	0.33	0.32
下降气流2	0.32	0.32	0.32	0.32	0.31
下降气流3	0.33	0.33	0.32	0.32	0.33

注:换笼台1、2、3为自主研发的国产设备,国外换笼台为国外某品牌产品,安全柜为某品牌Ⅱ级A2型生物安全柜,表中数据为每台设备检测3次的平均值。

表4 自主研发换笼台和某国外换笼台、生物安全柜的照度和噪声值比较

Table 4 Illuminance and noise value of self-developed cage changer and some foreign cage changer and biosafety cabinet

检测项目	换笼台1	换笼台2	换笼台3	国外换笼台	安全柜
背景照度/dB	324.00	320.25	320.00	324.50	342.00
照度/dB	715.00	733.00	738.50	718.75	760.00
背景噪声值/lx	53.67	53.67	54.33	53.33	55.00
噪声值/lx	64.00	64.33	65.33	65.33	66.00

注:换笼台1、2、3为自主研发的国产设备,国外换笼台为国外某品牌产品,安全柜为某品牌Ⅱ级A2型生物安全柜,表中数据为每台设备检测3次的平均值。

2.2.7 气流模式

根据YY 0569—2011标准中气流烟雾模式的检测方法,使用烟雾发生器检测换笼台台体主机和生物安全柜柜体的气流模式,如图2A所示。结果显示无气流沿前壁边缘外溢,气流稳定向下流动,不产生漩涡,无向上气流;流入气流进入前格栅,没有气流侵入工作区;在操作人员工作状态下,气流沿工作人员周边流入前格栅,未侵入工作区。检测结果符合Ⅱ级生物

安全柜要求。

2.3 污染物品回收舱和器物表面灭菌舱气密性检测结果

根据YY 0569—2011标准,使用肥皂泡法检测污染物品回收舱和右侧消毒设备的气密性,检测结果如图2B和C所示,发现没有产生气泡及气泡破裂的声音,证明污染物品回收舱和器物表面灭菌舱的气密性均良好。

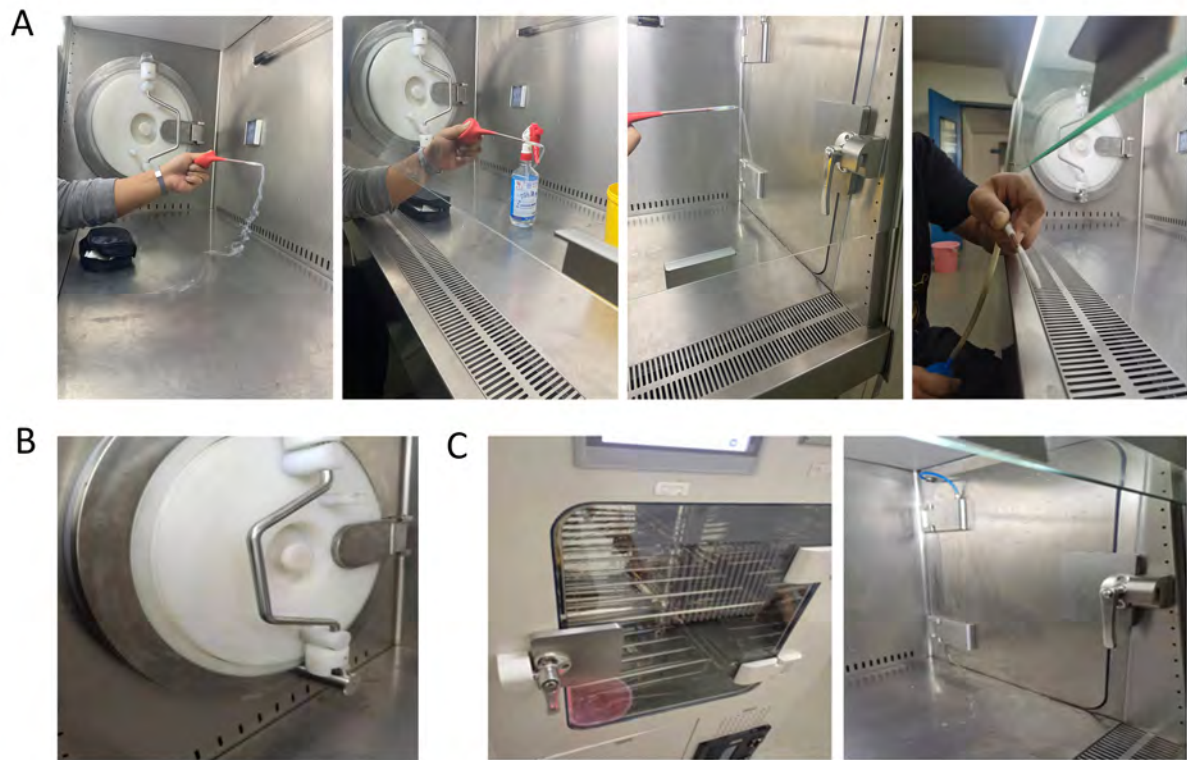


图2 气流模式检测图(A)和肥皂泡法检测污染物品回收舱(B)及器物表面灭菌舱(C)的气密性
Figure 2 Inspection chart of airflow pattern (A), testing the air tightness of the contaminated goods recovery cabin (B) and the sterilization chamber of utensil surface (C) by soap bubble method

2.4 换笼台实际使用操作效果

自主研发的换笼台台体外形尺寸、工作区尺寸和

前窗开口水平尺寸均可以满足操作要求。工作区的水平、进深、高度尺寸能满足操作IVC笼盒的需要。器

物表面灭菌舱数字显示屏操作方便,舱门操作顺畅。以枯草芽孢杆菌作为指示菌,将菌液均匀涂抹于笼盒表面,启动消毒程序,运行完毕后检测笼盒表面的灭菌效果,结果显示接种枯草芽孢杆菌的平板未见菌落生长,阳性对照有菌落生长,说明消毒效果良好。污染物品回收舱结构设计合理,更换下来的脏笼盒、垫料等传递无泄漏,经过高温高压处理后,笼盒内表面涂布的所有培养皿中均未见到菌落生长,说明灭菌效果良好。

3 讨论

目前,IVC在我国实验动物设施中使用率很高,广泛应用于动物实验和动物饲养。负压IVC笼盒是高等级生物安全实验室饲养小鼠及感染实验中普遍采用的设备,饲养的动物可能感染高致病性病原体,实验结束后或更换笼盒时需要打开笼盒进行操作,包括脏笼盒及垫料更换、饲料和饮水添加等过程都可能会对动物设施中的工作人员、设施和环境造成污染^[5]。如果在Ⅱ级生物安全柜进行换笼操作,仅能保证动物不被污染,无法保证待更换新笼盒的清洁,更换后的脏笼盒移出生物安全柜时也会造成实验环境污染和操作者感染,且操作繁琐。因此,在生物安全实验室中更换负压IVC笼盒时,急需生物安全型IVC笼盒换笼工作台的支持,并且有必要对换笼操作进行规范化管理,以确保实验者、实验对象及实验环境的安全。

生物安全柜是病原微生物实验室中重要的安全防护设备,可以保护试验人员、环境和样品,目前已广泛应用于医院、科研实验室,以及食品、药品和疫苗研发等多个领域。参考生物安全柜的工作原理,研发出的生物安全型换笼台也得到应用^[6-7]。但是目前市场上生物安全型换笼台被国外垄断,产品主要来自意大利和美国公司,法国和韩国占少量份额。进口的生物安全型换笼台产品每次只能更换1个笼盒,而且还存在整体质量和体积偏大、价格偏高、液体浸泡对笼盒内动物可能存在影响等弊端。因此,本团队针对我国生物安全实验室建设的这一重大需求,自主研发了适用的生物安全型换笼台,实现了该产品的国产化,其关键技术自主可控。

由于换笼台的主体操作部分主要是参考Ⅱ级生物安全柜来设计,以实现在高等级生物安全实验室应用的目的^[5-6]。因此,本研究以国外某换笼台产品和进口Ⅱ级A2型生物安全柜为对照,对自主研发的换笼台进行检测。根据生物安全柜相关标准,检测内容包括

外观、材料、结构、高效过滤器完整性、噪声、照度、气流流速、气流模式等^[8-16]。通过对比测试研究显示,本团队研发的换笼台主体操作部分的外观、材料、结构、高效过滤器、噪声、照度、气流流速和气流模式等物理学指标均符合相关标准要求。进一步对污染物品回收舱及器物表面灭菌舱的相关指标进行测试,由于没有针对两种舱体气密性检测的标准,故参考YY 0569—2011标准采用肥皂泡法进行检测,结果表明污染物品回收舱和器物表面灭菌舱的气密性良好,达到YY 0569—2011标准要求。有关污染物品回收舱和器物表面灭菌舱的灭菌效果等另撰文探讨。

将自主研发的换笼台与国外某换笼台产品一起进行对比性实际操作,主要步骤包括:接通电源,开机,换笼前开启操作门,开风机、照明灯,传入新笼盒及待更换笼盒,更换笼盒,新笼盒传入右侧消毒仓,关闭舱门,开启消毒程序对新笼盒表面消毒,替换的脏笼盒传入左侧污染物品回收舱,送高压灭菌器灭菌,操作结束后对操作台进行表面消毒,打开紫外灯消毒,完成后关闭电源。两者的操作区别如下:(1)开启操作门的方式不同;(2)对新笼盒表面消毒的方式也不同,自主研发的换笼台的器物表面灭菌舱使用雾化过氧化氢方式消毒,而国外换笼台是用消毒液浸泡的方式消毒;(3)每次更换笼盒的数量也不同,自主研发的换笼台每次可同时消毒4个笼盒,国外换笼台每次仅能消毒1个笼盒。

通过实际换笼操作证明,本团队自主研发的换笼台不仅可以保证换笼效果,而且明显提高了换笼效率,提示这一生物安全型换笼工作台符合实用和安全的要求。在此基础上,笔者建议在产品升级与产业化时可适当增加换笼台的台体尺寸,将会更加方便换笼操作;同时,将紫外线灯设计成可收缩模式,可以防止长时间照射对设备材质产生影响;另外,增加污染物品回收舱的数量,配置脏笼盒收集袋,可以提升笼盒更换效率且便于操作。

生物安全型换笼工作台和IVC是实验动物屏障设施与生物安全实验室的重要设备。根据RB/T 199—2015与RB/T 010—2019标准,生物安全柜和IVC的检测时机至少应包括:安装后,投入使用前(包括生物安全柜被移动位置后);更换高效空气过滤器或内部部件维修后;年度的维护检测。因此,建议实验动物设施和生物安全实验室中使用的换笼台和负压IVC应进行年度性检测预评价,并纳入实验动物行政许可的检测内容,以保证实验动物、人员和环境的安全。

[作者贡献]

苏世博：换笼台的台体完整性与稳定性等主要性能检测，论文撰写与修改；

马文杰：换笼台的洁净度、高效过滤器检漏等主要性能检测，论文撰写与修改；

王伟：参与实验设计与检测，论文修改；

郭慧娟、康雷、刘守琦、苟春天、张伟、王梓：参与换笼台的部分性能检测及对比实验；

张贺、刘怀然、司昌德：设备检测与数据分析；

陈洪岩：实验设计、论文审核、论文修改。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 赵焱. 高级别生物安全实验室降低高致病性病毒实验生物安全防护水平的科研策略[J]. 病毒学报, 2021, 37(3): 755-757. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003906.
- [2] 王宠, 郑琳琳, 王在峰. 生态环境监测实验室生物安全风险因子分析及防控措施[J]. 环境与发展, 2021, 33(2): 157-164. DOI: 10.16647/j.cnki.cn15-1369/X.2021.02.029.
- [3] 《实验动物与比较医学》编辑部. 《中华人民共和国生物安全法》: 病原微生物实验室生物安全[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 465.
- [4] 刘静, 李超, 柳金雄, 等. 高等级生物安全实验室在生物安全领域的作用及其发展的思考[J]. 中国农业科学, 2020, 53(1): 74-80. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.01.007.
- [5] 李鹏辉, 张宗兴, 徐新喜. 生物安全实验室初级防护设备和废弃物处理设备现状及发展建议[J]. 医疗卫生装备, 2021, 42(5): 59-65. DOI: 10.19745/j.1003-8868.2021100.

- [6] 张宗兴, 吴金辉, 衣颖, 等. 我国生物安全实验室关键防护技术与装备发展概况[J]. 中国卫生工程学, 2019, 18(5): 641-646.
- [7] 苏冠民, 孟蔚, 温宪芹, 等. 山东省Ⅱ级生物安全柜性能测试及分析[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(11): 872-873. DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2018.11.024.
- [8] 唐志坚, 赵生仓, 杨维雄, 等. 某单位Ⅱ级生物安全柜性能测试与分析[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(8): 723-725. DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2016.08.003.
- [9] 国家食品药品监督管理局. Ⅱ级生物安全柜: YY 0569—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [10] 国家认证认可监督管理委员会. 实验室设备生物安全性能评价技术规范: RB/T 199—2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 生物安全柜: JG 170-2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化管理委员会. 实验室生物安全通用要求: 19489—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [13] 中国国家认证认可监督管理委员会. 实验动物屏障和隔离装置评价通用要求: RB/T 010—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [14] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 生物安全实验室建筑技术规范: GB 50346—2011[S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2012.
- [15] 教霞, 刘越连, 杨舒筠, 等. 2019年疾控中心生物安全柜性能检测分析[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(22): 3838-3839. DOI: 10.11655/zgywylc.2020.22.062.
- [16] 杜丽雯. 生物安全柜高效过滤器完整性测试与分析[J]. 中国设备工程, 2020(4): 157-159.

(收稿日期: 2021-06-02 修回日期: 2022-02-28)

(本文编辑: 张俊彦, 丁宇菁)

《中华人民共和国生物安全法》：生物安全能力建设

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过，自2021年4月15日起施行。

第八章 生物安全能力建设

第六十六条 国家制定生物安全事业发展规划，加强生物安全能力建设，提高应对生物安全事件的能力和水平。县级以上人民政府应当支持生物安全事业发展，按照事权划分，将支持下列生物安全事业发展的相关支出列入政府预算：（1）监测网络的构建和运行；（2）应急处置和防控物资的储备；（3）关键基础设施的建设和运行；（4）关键技术和产品的研究、开发；（5）人类遗传资源和生物资源的调查、保藏；（6）法律法规规定的其他重要生物安全事业。

第六十七条 国家采取措施支持生物安全科技研究，加强生物安全风险防御与管控技术研究，整合优势力量和资源，建立多学科、多部门协同创新的联合攻关机制，推动生物安全核心关键技术和重大防御产品的成果产出与转化应用，提高生物安全的科技保障能力。

第六十八条 国家统筹布局全国生物安全基础设施建设。国务院有关部门根据职责分工，加快建设生物信息、人类遗传资源保藏、菌（毒）种保藏、动植物遗传资源保藏、高等级病原微生物实验室等方面的生物安全国家战略资源平台，建立共享利用机制，为生物安全科技创新提供战略保障和支撑。

第六十九条 国务院有关部门根据职责分工，加强生物基础科学研究人才和生物领域专业技术人才培养，推动生物基础科学学科建设和科学研究。国家生物安全基础设施重要岗位的从业人员应当具备符合要求的资格，相关信息应当向国务院有关部门备案，并接受岗位培训。

第七十条 国家加强重大新发突发传染病、动植物疫情等生物安全风险防控的物资储备。国家加强生物安全应急药品、装备等物资的研究、开发和技术储备。国务院有关部门根据职责分工，落实生物安全应急药品、装备等物资研究、开发和技术储备的相关措施。国务院有关部门和县级以上地方人民政府及其有关部门应当保障生物安全事件应急处置所需的医疗救护设备、救治药品、医疗器械等物资的生产、供应和调配；交通运输主管部门应当及时组织协调运输经营单位优先运送。

第七十一条 国家对从事高致病性病原微生物实验活动、生物安全事件现场处置等高风险生物安全工作的人员，提供有效的防护措施和医疗保障。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)

部分兽医相关单位Ⅱ级生物安全柜的性能测试与分析

马文杰, 张 伟, 王 伟, 苏世博, 郭慧娟, 张 贺, 王 梓, 刘怀然, 陈洪岩

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 国家禽类实验动物资源库, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 150069)

[摘要] **目的** 了解兽医相关单位实验室Ⅱ级生物安全柜的性能与使用情况。**方法** 测试哈尔滨市3家兽医相关单位正在使用的126台Ⅱ级生物安全柜, 依据相关标准针对检测结果进行性能指标的判定与分析, 了解生物安全柜的使用情况。**结果** 126台Ⅱ级生物安全柜性能检测总合格率为17.5%。Ⅱ级生物安全柜的外观完整性、工作区洁净度、送排风高效过滤器检漏、气流模式、流入气流流速、下降气流流速、照度、噪声及报警和联锁系统共9个项目的检测总合格率分别为100%、100%、100%、100%、49.2%、92.9%、68.3%、22.2%和100%。**结论** 兽医相关单位实验室Ⅱ级生物安全柜性能检测总合格率较低, 应对生物安全柜做定期性能检测, 加强运行维护管理, 及时排除生物安全隐患, 防止实验室感染事故发生。

[关键词] 生物安全柜; 性能检测; 兽医实验室

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0111-06

Performance Analysis of Class II Biosafety Cabinetry in Veterinary-related Research Institutes

MA Wenjie, ZHANG Wei, WANG Wei, SU Shibo, GUO Huijuan, ZHANG He, WANG Zi, LIU Huairan, CHEN Hongyan

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, National Poultry Laboratory Animal Resource Center, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Correspondence to: CHEN Hongyan, E-mail: chenhongyan@caas.cn

[ABSTRACT] **Objective** To detect the performance and use of class II biosafety cabinets in laboratories of veterinary-related research institutes. **Methods** A total of 126 class II biological safety cabinetries being used by three veterinary-related research institutes in Harbin were tested. The performance indicators were judged according to the test results and analyzed according to relevant standards, in order to understand the use of biological safety cabinets. **Results** The overall pass rate of 126 biosafety cabinetries was 17.5%. The total qualified rate were 100%, 100%, 100%, 100%, 49.2%, 92.9%, 68.3%, 22.2% and 100%, respectively in terms of the appearance of integrity, cleanliness of work area, integrity of high efficiency filter for supply and exhaust air, flow pattern, the velocity of inflow, the velocity of the downdraft, noise, illumination and alarm and interlock system of class II biosafety cabinet. **Conclusion** The overall pass rate of biosafety cabinetries in some veterinary-related research institutes is low. Regular inspection, operation and maintenance management should be strengthened to eliminate biological safety hazard timely and prevent infection accidents of laboratory.

[Key words] Biosafety cabinetry; Parameters test; Veterinary laboratory

生物安全柜是一种负压过滤排风柜, 可避免实验操作人员和环境暴露于实验过程中产生的生物气溶胶,

是防止实验室获得性感染的主要设备。在控制实验室感染, 保护实验人员、实验环境和实验材料不被污染

[基金项目] 国家重点研发计划项目: BSL-4实验室IVC笼盒更换工作台的研制及应用(2018YFC1200301); 手套箱式生物隔离器和感染动物隔离设备的研发(2016YFC1201401)

[作者简介] 马文杰(1992—), 男, 博士研究生, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: qd1992mwj@163.com

[通信作者] 陈洪岩(1963—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: chenhongyan@caas.cn

等方面起着至关重要的作用^[1-2]。根据常用的欧盟标准 EN 12469—2000, 生物安全柜可按照气流及隔离设计结构不同, 分为 I、II、III 共 3 个等级。II 级生物安全柜是指用于确保实验操作人员安全、处理样品安全与环境安全的通风安全柜, 它在 I 级生物安全柜的基础上做了进一步的改造, 可使到达工作区域前的未过滤空气被内置风机引入风格栅, 从而达到对实验操作人员和实验室环境的保护要求。

按照中华人民共和国医药行业标准 YY 0569—2011《生物安全柜》规定, II 级生物安全柜可依照入口气流流速、排气方式和循环方式不同分为 4 个级别: A1 型、A2 型、B1 型和 B2 型^[3]。A1 型生物安全柜前窗流入气体的流速应 ≥ 0.38 m/s, 70% 气体通过高效空气过滤器 (high efficiency particulate air filter, HEPA) 循环利用, 30% 的气体被外排出去。A2 型生物安全柜前窗流入气体的流度应 ≥ 0.5 m/s, 70% 气体通过 HEPA 过滤器循环利用, 30% 的气体被外排出去。B1 型生物安全柜的 70% 气体通过 HEPA 过滤器排气口排出, 30% 的气体通过 HEPA 过滤器供气口再循环至工作区。B2 型为 100% 全排型安全柜, 无内部循环气流, 可同时提供生物性和化学性安全控制。A1、A2 型生物安全柜外排气量相对较少, 对实验室气流影响偏小, 而 B1、B2 型生物安全柜外排气量较多, 对实验室气流影响较大。

II 级生物安全柜是生物医学、兽医学实验室最为常用的一级保护屏障, 也是保障实验室生物安全最重要的设备之一, 广泛应用于医院、研究所、高校等机构开展的生物医药研究与检测工作中, 其性能的好坏直接影响实验人员与实验室的安全。本研究参照 YY 0569—2011 和 RB/T 199—2015 标准, 针对部分兽医相关单位的 126 台 II 级生物安全柜进行调查和日常维护性检测, 即对外观完整性、工作区洁净度、送排风高效过滤器检漏、气流模式、流入气流流速、下降气流流速、噪声、照度以及报警和联锁系统共 9 项指标进行现场检测, 并对数据进行分析处理, 以期生物安全柜使用单位及科研人员进一步了解实验室生物安全柜的运行现状, 更好地使用生物安全柜, 杜绝安全隐患提供第一手资料, 并为后续开展以 II 级生物安全柜为基础的生物安全型换笼工作台的研发及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 检测设备

主要检测设备包括德国 testo 540 照度计 (精度 $\pm$

3%)、芬兰 vaisala HM41 手持式温湿度计 ($\pm 1.5\%$ RH、 $\pm 0.2^\circ\text{C}$)、中国数字声级计 TES-1350A、美国 Lighthouse HANDHELD 3016 手持式激光粒子/尘埃粒子计数器 (精度 10%)、法国 KIMO VT110 便携式风速仪 (精确度: ± 0.05 m/s)、美国 TSI 雾化气溶胶发生器 3079。这些设备均为黑龙江省实验动物质量监督检验站 (通过 CMA 资质认定) 所有, 经过检定校准, 有效期为 2020 年 8 月—2021 年 8 月。检测人员为黑龙江省实验动物质量监督检验站检测员和团队科研人员, 专业技术能力合格。检测对象为哈尔滨某动物疫病研究单位、兽用生物制品生产单位、动物用生物制品研发孵化单位各一家, 目前所用的国内外 II 级生物安全柜共 126 台; 其中, A1 型生物安全柜 13 台, A2 型生物安全柜 113 台 (B1、B2 型应用较少, 本次不予检测); 国产生物安全柜 52 台, 进口生物安全柜 74 台。

1.2 生物安全柜性能检测方法

依据 YY 0569—2011《II 级生物安全柜》^[3]、JG 170—2005《生物安全柜》^[4]、GB 50346—2011《生物安全实验室建筑技术规范》^[5]以及 RB/T 199—2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》^[6]规定的方法, 对生物安全柜外观完整性、工作区洁净度、送排风高效过滤器检漏、气流模式、下降气流流速、流入气流流速、照度、噪声、报警和联锁系统等指标进行现场检测。

1.2.1 外观完整性

依据 YY 0569—2011 标准, 通过肉眼观察生物安全柜体表面有无明显划伤、压痕及锈斑, 表面是否光滑洁净, 设备外观是否规矩平整; 具有说明功能的文字、符号等标记是否表述清晰、正确, 且安装是否端正、牢固; 通过触摸的方式查看柜体焊接部位是否牢固, 并感知其焊接表面是否光滑^[4]。

1.2.2 工作区洁净度

依据 JG 170—2005 标准 (比 YY 0569—2011 更明确), 首先开启生物安全柜并单独运行 10 min 以上, 然后使用粒子计数器分别在高于工作台面 200 mm 处, 依照双对角线布置的 5 个采样点测定其尘埃粒子数, 采样完毕后对计数器进行自净并完成仪器的精度维护^[3]。

1.2.3 送排风高效过滤器检漏

送风高效过滤器检漏、排风高效过滤器检漏的检测方式可分为扫描检漏测试和效率法检漏测试两种^[6]。本实验采用扫描检漏测试方式, 即使用尘埃

粒子计数器测试高效过滤器的过滤效率。依照 YY 0569—2011 及 GB 50346—2011 标准规定, 首先用气溶胶发生器在安全柜气流上游产生质量浓度为 $20\ \mu\text{g/L}$ 的气溶胶, 然后在下游距离送排风高效过滤器出风面和边框缝隙 $20\ \text{mm}$ 处, 用粒子计数器的采样口对整个高效过滤器的工作面进行扫描, 以检测气溶胶漏过率。扫描移动速度小于 $50\ \text{mm/s}$, 扫描路线应略微重叠。最后, 围绕整个过滤器外围, 沿组合过滤片和框架的连接处以及围绕过滤器和其他部件之间的密封处仔细扫描检测。所有检测点的漏过率不超过 0.01% [3, 5]。

1.2.4 气流模式

气流模式是甄别安全柜气流流向是否均匀、柜体结构设计是否合理的重要检测项目。为保护工作人员安全, 应确保安全柜内为负压状态, 且气体无外逸情况。本研究依据 YY 0569—2011 标准, 使用美国 TSI 雾化气溶胶发生器 3079, 沿工作台面的中心线, 在前窗操作口顶端以上 $100\ \text{mm}$ 的高度, 从安全柜的一端到另一端检测下降气流; 在观察窗后 $25\ \text{mm}$ 、前窗操作口顶端以上 $150\ \text{mm}$ 的高度, 从安全柜的一端到另一端检测观察窗气流; 在安全柜外约 $38\ \text{mm}$ 处, 沿着整个前窗操作口的周边, 检测前窗操作口边缘气流; 在操作者周边检测进入气流; 在滑动窗内, 从距安全柜侧壁和工作区顶部 $50\ \text{mm}$ 经过, 检测活动窗密闭性 [3]。

1.2.5 下降气流流速

依照 YY 0569—2011 标准, 在水平高度为高于前窗操作口上沿的 $100\ \text{mm}$ 处, 面向安全柜前窗由近至远设置 3 排测量点, 每排布置 7 个测量点, 间隔保持 $150\ \text{mm}$, 最外侧测量点距离安全柜内壁和前窗操作口 $150\ \text{mm}$ 。使用法国 KIMO VT110 便携式风速仪检测各测量点流速, 计算平均值, 作为下降气流流速 [3]。

1.2.6 流入气流流速

依照 YY 0569—2011 标准, 将生物安全柜工作窗升至常规操作高度, 横向选取 7 个位点; 每个位点纵向测量两个高度, 分别位于距离操作口上下沿 $1/4$ 的位置; 共 14 个测量点, 每个测量点的水平距离约 $100\ \text{mm}$, 且与前窗侧边距离不少于 $100\ \text{mm}$ 。使用法国 KIMO VT110 便携式风速仪在生物安全柜前窗操作口平面处检测各测量点流速, 将所有测量点数据的平均值作为流入气流流速 [3]。

1.2.7 照度

依照 YY 0569—2011 标准方法, 在工作台面内侧壁中心连线处选取 7 个测量点, 两侧测量点均距离侧

壁 $150\ \text{mm}$ 以上, 各点之间距离 $< 300\ \text{mm}$ 。用照度计分别在安全柜照明设备关闭和开启的状态下测定工作台面的背景照度和照度。评价合格的标准为平均背景照度为 $(110 \pm 50)\ \text{lx}$, 平均照度 $\geq 650\ \text{lx}$, 且每个测量点的照度实测值 $\geq 430\ \text{lx}$ [3]。

1.2.8 噪声

依照 YY 0569—2011 标准, 首先在打开安全柜风机、开启照明设备的情况下, 在生物安全柜前方中心向外 $300\ \text{mm}$, 高于工作台面 $380\ \text{mm}$ 处, 使用中国数字声级计 TES-1350A 检测工作噪声, 合格标准为 $\leq 67\ \text{dB}$ 。关闭风机和照明设备后, 于同一检测点收集背景噪声, 若背景值 $> 57\ \text{dB}$, 需对环境及设备进行修正 [3]。

1.2.9 报警和联锁系统

报警和联锁系统的检测主要是为了在安全柜处于前窗开启高度过高或过低、气流波动、排气损失、风机停止运行等非正常状态时, 声光报警器报警, 提示操作人员立刻停止实验, 通知维修人员进行检修。该项目是安全柜防护的最后一道屏障 [6]。本研究根据 YY 0569—2011 标准, 分别检测了前窗操作口报警、内部供/排气风机联锁报警、II 级生物安全柜排气报警及气流波动报警以及紫外灯联锁功能 [7]。

1.3 测试结果的统计分析

采用 SPSS 22 软件进行统计学处理, 数据比较采用卡方检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 II 级生物安全柜各检测指标基本情况

2.1.1 外观完整性

依次对 126 台生物安全柜表面进行检查, 结果显示: 所有柜体外观规矩平整, 且无明显锈斑及损伤痕迹; 具有说明功能的文字、图形符号等标记指向清晰, 描述正确, 安装端正且牢固; 柜体焊接部位牢固, 焊接表面手感光滑且无松散感。该检测指标合格率为 100% 。

2.1.2 工作区洁净度

通过工作台面尘埃粒子检测发现, 所有柜体工作区均达到 100 级 (标准 5 级) 洁净度要求, 合格率为 100% 。其中, 两台国产生物安全柜的工作台面上, $\geq 0.5\ \mu\text{m}$ 的悬浮粒子检测结果分别为 $47\ \text{粒}/\text{m}^3$ 和 $392\ \text{粒}/\text{m}^3$, $\geq 1\ \mu\text{m}$ 的悬浮粒子检测结果分别为 $3\ \text{粒}/\text{m}^3$ 和 $49\ \text{粒}/\text{m}^3$, $\geq 5\ \mu\text{m}$ 的悬浮粒子检测结果分别为 $0\ \text{粒}/\text{m}^3$ 和 $7\ \text{粒}/\text{m}^3$ 。另有 21 台国产生物安全柜的工作台面上 $\geq 0.5\ \mu\text{m}$ 的悬浮粒

子检测到1至2粒/m³。其余生物安全柜在3种不同悬浮粒子的检测结果中均为0粒/m³。

2.1.3 送排风高效过滤器检漏

126台生物安全柜的送风、排风高效过滤器在任何检测点的漏过率均<0.01%。该项目检测合格率达100%。

2.1.4 气流模式

使用烟雾发生器针对下降气流、观察窗流入气流、操作人员周边气流、工作窗口边缘气流和移动窗密闭性进行检测。观察结果显示,下降气流及观察窗气流为垂直气流线,且无死角和回流。工作窗开口边缘隔离效果的气流试验结果显示,烟雾进入安全柜内无外逸,且无穿越工作区气流。工作窗口开口气流密封效果试验结果发现,没有烟雾从生物柜内泄漏出来,也没有烟雾侵入工作区。操作人员周边气流试验结果表明,没有工作区内气流溢出,也没有烟雾侵入工作区。检测结果提示所有检测样本均合格。

2.1.5 下降气流流速、流入气流流速

依照标准要求,下降气流流速应在0.25 m/s和0.50 m/s之间,流入气流流速应A1型≥0.40 m/s,A2型、B1型和B2型均≥0.50 m/s。对126台Ⅱ级生物安全柜进行下降气流流速和流入气流流速的检测,结果如表1所示。13台Ⅱ级A1型生物安全柜的下降气流流速范围为0.28~0.49 m/s,合格率为100%;流入气流流速范围为0.25~0.56 m/s,合格率为69.2%,更换高效过滤器后合格率为84.6%。113台Ⅱ级A2生物安全柜的下降气流流速为0.28~0.65 m/s,合格率为92%,更换高效过滤器后合格率为96.5%;流入气流流速范围

为0.19~1.00 m/s,合格率为46.9%,更换高效过滤器后合格率为72.6%。

2.1.6 照度

依照标准要求,平均照度≥650 lx且各位点实测值≥430 lx,可判定合格。结果显示,Ⅱ级A1型生物安全柜的照度合格率为69.2%,更换照明灯后合格率为92.3%;Ⅱ级A2型生物安全柜的照度合格率为68.1%,更换照明灯后合格率为85.8%。116台生物安全柜的照度总合格率为68.3%,更换照明灯后合格率为86.5%。具体数据见表1。

2.1.7 噪声

依据标准要求,噪声≤67 dB视为合格。检测结果显示,Ⅱ级A1型生物安全柜的噪声测量值为66~75 dB,仅1台机器符合标准要求,合格率仅7.7%,更换高效过滤器后合格率为23.1%;Ⅱ级A2型生物安全柜的噪声检测合格率同样较低,为23.9%,更换高效过滤器后合格率为29.2%;总合格率为22.2%,更换高效过滤器后合格率为28.6%,见表1。

2.1.8 报警和联锁系统

依据标准要求,当生物安全柜前窗偏离工作高度时,声音报警器报警,联锁系统启动;开启高度达到标称高度时,自动解除报警及联锁系统。安全柜可实时显示工作区的下降气流流速及流入气流流速,当下降气流流速和流入气流流速波动超过标称值的±20%时,启动声光报警器。将玻璃前窗完全关闭,紫外线灯才能激活;如果紫外线灭菌过程中前窗被意外升起,紫外线灯将自动关闭。经检验,126台生物安全柜均符合上述要求,合格率为100%。

表1 Ⅱ级A1及A2型生物安全柜各项指标检测结果

Table 1 Test results of various indicators of A1 and A2 class Ⅱ biosafety cabinetries

检测项目	Ⅱ级A1型生物安全柜(n=13)				Ⅱ级A2型生物安全柜(n=113)				合计(N=126)			
	检测数	合格数	合格率/%	修正合格率/%	检测数	合格数	合格率/%	修正合格率/%	检测数	合格数	合格率/%	修正合格率/%
外观完整性	13	13	100.0	100.0	113	113	100.0	100.0	126	126	100.0	100.0
工作区洁净度	13	13	100.0	100.0	113	113	100.0	100.0	126	126	100.0	100.0
送排风高效过滤器检漏	13	13	100.0	100.0	113	113	100.0	100.0	126	126	100.0	100.0
气流模式	13	13	100.0	100.0	113	113	100.0	100.0	126	126	100.0	100.0
下降气流流速	13	13	100.0	100.0	113	104	92.0	96.5	126	117	92.9	96.8
流入气流流速	13	9	69.2	84.6	113	53	46.9	72.6	126	62	49.2	73.8
照度	13	9	69.2	92.3	113	77	68.1	85.8	126	86	68.3	86.5
噪声	13	1	7.7	23.1	113	27	23.9	29.2	126	28	22.2	28.6
报警和联锁系统	13	13	100.0	100.0	113	113	100.0	100.0	126	126	100.0	100.0

注:修正合格率指更换高效过滤器或照明灯后的合格率。

2.2 不同产地Ⅱ级生物安全柜的各项指标比较

根据相关标准及规范,各项检测指标只要有一项不合格就代表该生物安全柜不合格^[3-4]。结合各项目检测结果,最终判定126台Ⅱ级生物安全柜的合格数为22台,合格率仅17.5%。合格的Ⅱ级生物安全柜中,A1型生物安全柜仅1台,A2型生物安全柜有21台,进口生物安全柜20台,国产生物安全柜2台(仅占比9.1%)。国产生物安全柜的合格率为3.8%(2/52),进口生物安全柜的合格率为27.0%(20/74),二者差异有明显的统计学意义(经卡方检验, $P=0.000\ 74$)。

将进口与国产Ⅱ级生物安全柜的各检测指标数据进行比较,结果如表2。其外观完整性、工作区洁净度和下降气流流速等指标均表现出较高的合格率,均>90%。流入气流流速与噪声的合格率差异较大,且合格率较低,分别为33.8%和5.8%。

表2 进口和国产Ⅱ级生物安全柜各项指标检测结果对比
Table 1 Test results of various indicators of imported and domestic class Ⅱ biosafety cabinetries

检测项目	(N=126)					
	进口生物安全柜 (n=52)			国产生物安全柜 (n=74)		
	检测 数	合格 数	合格 率/%	检测 数	合格 数	合格 率/%
外观完整性	74	74	100.0	52	52	100.0
工作区洁净度	74	74	100.0	52	52	100.0
送排风高效过滤器检漏	74	74	100.0	52	52	100.0
气流模式	74	74	100.0	52	52	100.0
下降气流流速	74	68	91.9	52	49	94.2
流入气流流速	74	45	60.8	52	17	32.7
照度	74	53	71.6	52	33	63.5
噪声	74	25	33.8	52	3	5.8
报警和连锁系统	74	74	100.0	52	52	100.0

3 讨论

2019年某单位布鲁氏菌感染事件与2020年新冠肺炎(COVID-19)疫情暴发受到了各级政府、科研实验人员的广泛关注,实验室生物安全的重要性问题再次被提及^[8]。Ⅱ级生物安全柜是实验室最常用、最重要的生物安全一级保护屏障,也是动物生物安全实验室的常用设备之一,不仅用于病原体相关的实验操作,而且因其与生物安全型独立通风笼具(individual ventilated cages, IVC)换笼工作台有相似的结构与功

能,也经常作为初级换笼台使用。因此,了解Ⅱ级生物安全柜的性能与使用,对于规范动物生物安全实验室设备操作,研发新的生物安全型IVC换笼工作台有一定的借鉴意义。Ⅱ级生物安全柜通过垂直气流和流入气流保护操作人员不被柜内样品感染,其中外界空气经高效过滤器过滤后流入柜内,防止样品被污染;柜内气体也经过高效过滤器过滤,再排放到环境中,以保证不污染室内外环境。Ⅱ级生物安全柜的性能是否可靠,与操作人员的安全、样品与环境的污染息息相关,因此对其性能和质量进行检测显得尤为重要。

根据RB/T 199—2015标准,现场检测项目至少应包括垂直气流平均速度、气流模式、工作窗口气流平均速度、送排风高效过滤器检漏、工作区洁净度。本研究对哈尔滨3家动物疫病相关单位实验室的126台Ⅱ级生物安全柜进行维护检测,检测内容除包括RB/T 199—2015标准中的检测项目外,还按照YY 0569—2011标准检测了外观完整性、噪声、照度及警报和连锁系统,共9个项目。检测结果显示:126台Ⅱ级生物安全柜的外观完整性、工作区洁净度的总合格率为100%,下降气流流速总合格率为92.9%,流入气流流速总合格率为49.2%,照度总合格率为68.3%,噪声总合格率为22.2%。

相较于教霞等^[8]和温占波等^[2]的检测结果,本次检测中生物安全柜流入气流流速、噪声、照度的合格率偏低。流入气流流速合格率低的原因可能是:(1)长时间的使用且未按照规定进行常规检查(通常应每年一次),生物安全柜的维护不及时,导致初效滤膜及高效过滤器堵塞;(2)风机老化或柜体安装不合理导致气格栅堵塞,这需要专业维修人员进一步对生物安全柜进行检修确定。噪声合格率低的原因可能是安全柜空间摆放位置不合理,比如安放不稳定,过于靠近门窗等位置,设备运行时未关闭门窗,导致外界环境噪声、气流对生物安全柜产生影响。照度合格率低的原因可能是长时间使用导致照明灯有损坏或者照度值略低于标准要求。本次检测后向使用单位提出更换高效过滤器或照明灯等配件的建议,并在使用单位更换高效过滤器或照明灯后,再次对相关指标进行检测时发行,相关指标的合格率有大幅度提高。据此提示,生物安全柜在使用中需要定期检测、维保及更换配件,以保证操作人员、样品与实验室环境的安全。

仪器设备空间摆放位置的合理性是确保实验人员和生物安全柜正常运行的关键。紧靠门、窗、墙面和实验室进风口摆放可能导致外部气流扰乱生物安全柜

柜体中气流模式,使外界未经高效过滤的空气污染物进入实验区域,污染实验样品^[10]。因此,应将生物安全柜安装在远离门、窗的位置,也不应临近空调送风口。安全柜应安放在远离人员通道及有潜在的干扰气流的位置,柜子的后面及两侧应各留出30 cm的空隙,以便在保养时检修人员容易通过;另外在柜子的顶部应有30~35 cm的空隙,以利于准确测量通过高效过滤器的气流速度,以及更换高效过滤器^[11]。此外,安全柜支架下方不应摆放小型设备、实验耗材等物品,以便于对安全柜下方进行维护和清洁,也不影响人员的操作。

生物安全柜的噪声、照度合格率较低,虽不会对使用安全性造成直接影响,但会影响实验人员工作舒适度和健康^[10]。对国产和进口生物安全柜各项指标的合格率进行统计学分析比较发现,两者之间存在显著性差异;其中流入气流流速与噪声两项指标的合格率差异较大,可能是造成整体差异的主要原因之一。这提示国产生物安全柜质量还有待提高。此外,本次调查还发现生物安全柜的使用、运维方面也存在一些问题,例如紫外线灯超期使用,清洁、消毒不规范,不定期检测、监测,无定期培训等。因此,加强培训、养护、定期检测是保障生物安全柜规范使用、相关实验结果正确性及生物安全所必不可少的。

本次检测主要依据YY 0569—2011等标准进行。该标准以美国标准NSF 49: 2019为基础^[12],并结合了欧盟标准EN 12469: 2000中的特色^[13]。比如,YY 0569—2011标准采用上述两种国际标准中相同的工作原理对操作人员、实验品和工作环境提供保护,并在此基础上按照排放气流在系统总流量中占比和内部结构分为A1、A2、B1、B2四种类型;下降气流流速指标在增加测试点的同时,依照EN 12469规定,添加风速范围以便提升准确度等^[13]。YY 0569比NSF 49和EN 12469要求更高,体现在风速的精确度和紫外线灯的强度要求方面,进而明确了生物安全柜各项性能的检测标准,规范了实验室生物安全柜的使用。

综上所述,生物安全柜作为生物安全实验室内一级防护屏障,可以对操作人员、环境和样品提供保护作用,其性能保障是实验室生物安全防护的重要基础。因此,生物安全柜的性能检测可使安全柜的质量得到有效控制,使生物安全效果得到保证。此次检测结果提示:生物安全柜安装位置的选择必须符合相关标准和要求,并且需要专业人员安装,做好安装后的现场验收,从而确保安装质量;在实验室生物安全柜管理

和维护中,应严格按照说明书规范使用,定期维护并进行相关项目检测,保持其良好的性能状态;如果发现异常,需要及时消除,确保安全柜的正常运行。

【作者贡献】

马文杰: 洁净度、高效过滤器检漏等检测;
张伟: 气流模式、气流速度等检测;
王伟: 生物安全柜等测试;
苏世博: 送排风、报警和联锁系统等检测;
郭慧娟: 照度、噪声等检测;
张贺: 数据分析;
王梓、刘怀然: 比对试验;
陈洪岩: 实验设计与审核。

【利益声明】所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献】

- [1] 唐志坚, 赵生仓, 杨维雄, 等. 某单位Ⅱ级生物安全柜性能测试与分析[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(8): 723-725. DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2016.08.003.
- [2] 温占波, 胡凌飞, 李劲松, 等. 病原微生物实验室Ⅱ级生物安全柜防护性能评价[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(8): 703-705, 709.
- [3] 国家食品药品监督管理局. Ⅱ级生物安全柜: YY 0569—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [4] 中华人民共和国建设部. 生物安全柜: JG 170—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [5] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 生物安全实验室建筑技术规范: GB 50346—2011[S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2012.
- [6] 国家认证认可监督管理委员会. 实验室设备生物安全性能评价技术规范: RB/T 199—2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [7] 苏冠民, 孟蔚, 温宪芹, 等. 山东省Ⅱ级生物安全柜性能测试及分析[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(11): 872-873. DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2018.11.024.
- [8] 教霞, 刘越连, 杨舒筠, 等. 2019年疾控中心生物安全柜性能检测分析[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(22): 3838-3839. DOI: 10.11655/zgywylc2020.22.062.
- [9] 刘晓革, 赖天兵, 刘建高, 等. 湖南省病原微生物实验室生物安全管理现状调查[J]. 实用预防医学, 2010, 17(6): 1212-1213. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2010.06.078.
- [10] 赵辉. 生物安全柜及使用要求[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(9): 862-864. DOI: 10.3760/j.issn: 1009-9158.2006.09.041.
- [11] 王会如, 王霖, 战盼. 深度解析在用Ⅱ级生物安全柜现状[J]. 中国医疗器械信息, 2019, 25(5): 43-47. DOI: 10.15971/j.cnki.cmdi.2019.05.017.
- [12] GILPIN R W, INTERNATIONAL N. Biosafety cabinetry: design, construction, performance, and field certification. Annex E: biosafety cabinet selection, installation, use, lifespan, and decommissioning contents[S]. 2018. DOI: 10.13140/RG.2.2.24231.60323.
- [13] European Committee for Standardization. Biotechnology Performance criteria for microbiological safety cabinets: EN12469: 2000[S]. Belgium: CEN, 2000: 6-11.

(收稿日期: 2021-06-02 修回日期: 2022-01-27)

(本文编辑: 张俊彦, 丁宇菁)

微电解无菌水系统在实验动物屏障设施中应用的跟踪监测

张 薇, 唐 彬, 赵 勇, 张志妮, 邓新燕

(中山大学实验动物中心, 广州 510006)

[摘要] **目的** 跟踪观察实验动物屏障设施长期应用微电解无菌水系统是否可以持续维持终端供水的无菌。**方法** 在2018年4月—2022年3月期间,每季度跟踪监测中山大学实验动物中心生产繁殖SPF级大小鼠的屏障设施中微电解无菌水系统1次。设置8个采样点,包括微电解出水口进入输水管道前取样点1个、终端出水口6个、输水管网回水取样点1个。按无菌操作流程取样,依据国家标准GB 14925—2010、GB/T 14926.41—2001进行微电解无菌水微生物检测。**结果** 2018年4月—2022年3月共进行17次采样;在微电解无菌水系统正常运行期间,8个采样点的微电解水均检测无菌,符合国家标准。**结论** 微电解无菌水系统能持续维持终端供水的无菌,可以长期应用于实验动物屏障设施。

[关键词] 微电解; 无菌水; 监测; 屏障设施; 实验动物

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0117-05

Tracking and Monitoring on Application of Micro-electrolyzed Sterile Water System in Laboratory Animal Barrier Facilities

ZHANG Wei, TANG Bin, ZHAO Yong, ZHANG Zhini, DENG Xinyan

(Laboratory Animal Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: ZHANG Wei, E-mail: zwygqj@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To track and observe whether the long-term application of micro-electrolyzed sterile water system in laboratory animal barrier facilities can continuously maintain the terminal water aseptic. **Methods** From April 2018 to March 2022, the microbiological detection of the micro-electrolyzed sterile water system had been tracked and monitored once each quarter in the barrier facilities of producing and breeding SPF grade rats and mice in Laboratory Animal Center of Sun Yat-sen University. Totally 8 sampling points were set, including one sampling point before the intake of the microelectrolyzed water outlet into the water duct, six sampling points at the terminal water outlet, and one sampling point for the water return of the water network. Samples were taken according to aseptic operation procedures, and microelectrolysis aseptic water was detected according to the national standards GB 14925—2010 and GB/T 14926.41—2001. **Results** From April 2018 to March 2022, a total of 17 tests were conducted. During the normal operation of the micro-electrolyzed sterile water system, the quality of micro-electrolyzed water at 8 sampling points was sterile, in line with the national standard. **Conclusion** Micro-electrolyzed sterile water system can maintain the sterility of the terminal water supply, and can be used in laboratory animal barrier facilities for a long time.

[Key words] Micro-electrolysis; Sterile water; Monitor; Barrier facilities; Laboratory animals

目前,国内实验动物屏障设施中无菌水的相关报告很少。实验动物屏障设施的无菌水系统犹如人体的血液循环系统,不仅供给动物不可或缺的饮用水,也

为屏障内的日常清洁等工作提供用水,是影响动物质量和干扰实验研究的潜在因素。根据国家标准《实验动物环境与设施》GB 14925—2010要求,清洁级以

[基金项目] 广东省科技基础条件建设项目:广东省实验动物大小鼠资源公共服务平台建设(2013B060300010)

[作者简介] 张 薇(1964—),女,高级实验师,硕士,从事中西医结合基础和实验动物研究工作。E-mail: zwygqj@163.com

上的实验动物饮用水应达到无菌要求；而对于清洁级以上屏障设施中日常工作用水则没有明确规定，但要求屏障环境中的沉降菌最大平均浓度〔每0.5 h内 $\phi 90$ mm平皿中菌落形成单位（colony-forming unit, CFU）〕 ≤ 3 。屏障环境用水一旦污染也将导致动物生存环境污染，因此，屏障设施内的日常工作用水也应达到无菌要求。有些屏障设施中无菌水系统制水不能持续保持无菌，遂采用高压灭菌器灭菌制备动物饮用水，而屏障设施内日常工作用水则采用添加化学消毒剂的方法制备。但是能达到灭菌效果的化学消毒剂较少，且化学消毒或灭菌剂效果受影响的因素较多，如物体表面有机物、尘埃、水的酸碱性及水中有机物等都会降低灭菌效果。因此，屏障环境工作用水同样需要控制微生物而达到无菌，才能消除屏障环境与动物污染隐患。

中山大学实验动物中心于2008年开始将微电解无菌水系统应用到屏障设施中供应SPF级动物饮用水和日常工作用水，并于2018年11月新增微电解仪备用

机。前期研究表明，微电解无菌水可以持续保持无菌，并对SD大鼠的血液生化等临床指标没有影响^[1]。2018年4月~2022年3月本中心对微电解无菌水系统的使用情况进行了跟踪观察，然后对微电解无菌水系统配置、运行管理中的细节加以总结和分析，以供同行借鉴。

1 材料与方法

1.1 微电解无菌水系统

微电解无菌水系统由超滤、微电解仪、循环输水管路和屏障设施内终端供水口组成。微电解仪1号和2号互为备用，当其中一台发生故障时，启用另外一台。微电解用220 V电源，实际工作电压 ≤ 80 V，功率为280 W；微电解仪产生的电流为2 A~10 A。超滤材料主要有5 μm 保安过滤器、1 μm 精密过滤器、0.1 μm 超滤膜。微电解无菌水系统由广州惜水科技有限公司提供。系统工艺流程见图1所示，虚线左侧为屏障环境设施内管网布局，右侧为屏障环境设施外管网及机房布局。

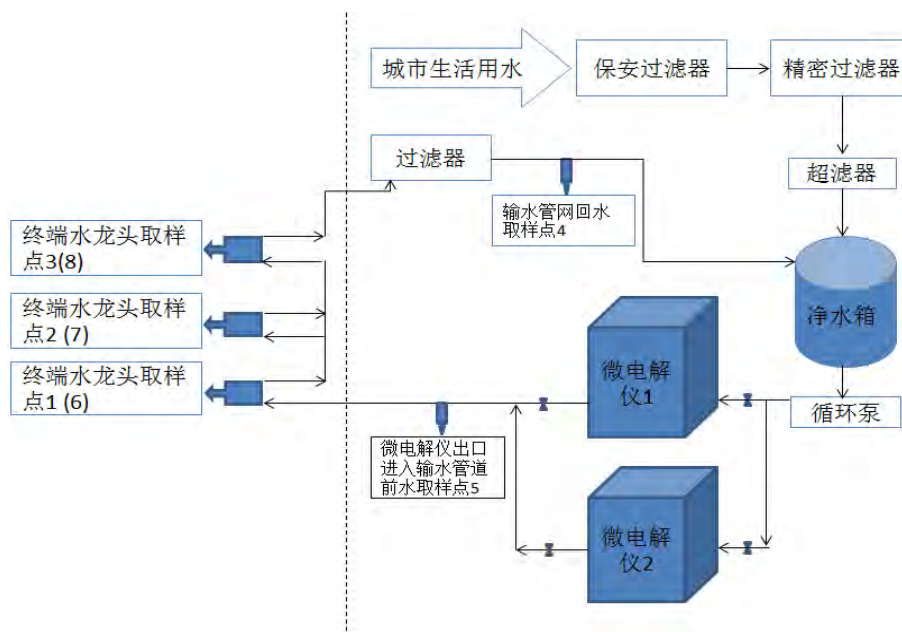


图1 微电解无菌水系统的工艺流程简图

Figure 1 Process flow diagram of micro-electrolyzed sterile water system

1.2 主要试剂与仪器

SPX-600 智能生化培养箱购自上海鸿都电子科技有限公司；DHP-9162 电热恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司；脑心浸液肉汤、硫乙醇酸钠肉汤无菌采样瓶、大豆蛋白冻肉汤培养基均购自于广东环凯

微生物科技有限公司；化学纯36%~38%盐酸购自广州化学试剂厂（批号：2021030216）。

1.3 水采样点的设置及编号

设8个取水样点。1、2号微电解仪的3个水龙头是共同的终端出水实体。屏障设施内3个终端水龙头对

应1号微电解仪的水样标记为1号、2号、3号取样点，对应2号微电解仪的水样标记为6号、7号、8号；屏障设施外微电解机房的2个取水点，即输水管网回水取样点（标记为4号）和微电解出水进入输水管网前取样点（标记为5号）各1个。

1.4 水样采集

超滤水采样：确认微电解仪均处于关闭状态，开启，1、2、3号终端出水口放水5 min，然后用酒精灯烧灼出水口，用采样瓶以无菌操作的方法对上述取水点进行水样采集，500 mL/瓶，每份水样各2瓶。

微电解水采样：开启微电解仪1 h后采样。采样点包括3个终端出水口（1号微电解仪启用时命名为1、2、3号水样；2号微电解仪启用时命名为6、7、8水样）、1个输水管网回水取样点4号、1个微电解出水口至输水管网前的取样点5号。对采样出水口放水5 min，用酒精灯烧灼出水口，以无菌操作的方法采集水样500 mL/瓶，每份水样各2瓶。

酸化水采样：对终端出水口的水人工添加36%~38%化学纯盐酸，达到pH测试纸值2.5~3，以无菌操作的方法采集水样500 mL/瓶，每份水样各2瓶。

1.5 样品接种培养

过滤法检测：依据《中华人民共和国药典》2020版中纯化水、注射用水的检测方法。于水平流洁净工作台上进行操作。每份样品随机取其中1瓶500 mL水样，经0.22 μm 无菌薄膜过滤器滤过后，取出滤膜，菌面向上贴于R2A 琼脂培养基，30~35 ℃培养至少5 d，观察菌落数。

国标法检测：依据国家标准GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》、GB 14926.41—2001《实验动物 无菌动物生活环境及粪便标准的检测方法》检测。另1瓶500 mL水样按无菌操作分别吸取0.5 mL样品，分别接种到脑心浸液肉汤、硫乙醇酸钠肉汤、大豆蛋白冻肉汤、血琼脂平皿培养基中。其中，接种脑心浸液肉汤、硫乙醇酸钠肉汤培养基后，置于(36±1) ℃培养至少14 d，并在第7和第14天时采用革兰染色法镜检；接种血琼脂平皿后，放置35~37 ℃培育箱中48~72 h，观察血琼脂平皿中有无细菌生长，以及其菌落数；接种大豆蛋白冻肉汤培养基后，置于25~28 ℃培养至少14 d，观察有无真菌生长。

1.6 结果判断

光学显微镜下未观察到细菌，同时R2A 琼脂培养基和血琼脂皿上无细菌生长，大豆蛋白冻肉汤培养基

中无真菌生长，即判断水质合格，无菌水符合无菌要求，结果表示为阴性“-”。任何一个培养基中出现阳性结果，即判断为不符合无菌要求，结果表示为阳性“+”。

2 结果

2.1 超滤水与微电解水的检测结果对比

关闭微电解仪时，经过超滤处理的1、2、3号水样进行微生物检测，结果均为阳性。开启2号微电解仪1 h后，4、5、6、7、8号水样进行微生物检测的结果均为阴性。两种水样采用过滤法的检测结果与依据GB 14925—2010、GB 14926.41—2001 国标检测的结果一致，具体见表1。

表1 超滤水与微电解水的检测结果比较
Table 1 Comparison between ultrafiltration water and micro electrolysis water

检测方 法	水样 1 [▽]	水样 2 [▽]	水样 3 [▽]	水样 4 [*]	水样 5 [*]	水样 6 [*]	水样 7 [*]	水样 8 [*]	酸化 水
过滤法	+	+	+	-	-	-	-	-	-
国标法	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注：水样1、2、3和6、7、8来自3个终端出水口（分别对应1号、2号微电解仪），水样4来自输水管网回水取样点，水样5来自微电解出水口至输水管网前的取样点。过滤法指按照《中华人民共和国药典》2020版中纯化水、注射用水的检测方法检测；国标法指依据国家标准GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》、GB 14926.41—2001《实验动物 无菌动物生活环境及粪便标准的检测方法》检测。[▽]表示未启动微电解仪1号和2号，终端水样是仅经过三道过滤的超滤水；^{*}是开启2号微电解仪后的取水样。- 示检测结果阴性；+ 示检测结果阳性。

2.2 微电解仪故障与正常运行期间的检测结果

2018年4月~2022年3月跟踪检测期间，在编号为20180921和20181011的二次连续检测时发现1、2、3号终端出水口水样有细菌，对应1号微电解仪故障，此后增加备用微电解仪（命名为2号微电解仪）；另外，在编号20210923和20211215的检测时发现6、7、8终端水样有细菌，对应2号微电解仪故障。结果提示，微电解仪正常运行时，终端水样检测结果为阴性；若微电解仪出现故障，终端水样检测结果为阳性（表2）。

2.3 微电解无菌水跟踪监测微生物结果

2018年4月~2022年3月共进行17次采样检测，除编号为20180921、20181011、20210923、20211215的终端水样检测有细菌（分别对应1号和2号微电解仪

故障)外,其他时间的跟踪检测结果显示微电解无菌水系统的终端出水口1、2、3、6、7、8水样、回水口4水样、微电解出水口5水样、酸化水样经培养14 d后均无细菌和真菌生长(表3),符合GB 14925—2010、GB/T 14926.41—2001国家标准。

表2 微电解仪故障时的水样检测结果

Table 2 Detection result of water samples in case of failure of micro-electrolyzed sterile water system

检测编号	水样1	水样2	水样3	水样4	水样5	水样6	水样7	水样8	酸化水
180921 [▽]	+	+	+	/	/	/	/	/	-
181011 ^{▽▽}	+	+	+	/	/	/	/	/	-
210923 [*]	/	/	/	/	/	+	+	+	-
211215 ^{**}	/	/	/	/	/	+	+	+	-

注:水样1、2、3和6、7、8来自3个终端出水口(分别对应1号、2号微电解仪),水样4来自输水管网回水取样点,水样5来自微电解出水口至输水管网前的取样点。[▽]表示1号微电解仪故障;^{▽▽}表示1号微电解故障,并对无菌水系统进行消毒清洗维护后的检测结果;^{*}表示2号微电解仪故障;^{**}表示2号微电解故障,并对无菌水系统进行消毒清洗维护后的检测结果。“-”检测结果阴性;“+”检测结果阳性。

表3 2018年4月—2022年3月微电解无菌水微生物检测情况
Table 3 Microbial detection of micro-electrolyzed sterile water from April 2018 to March 2021

编号	水样1	水样2	水样3	水样4	水样5	水样6	水样7	水样8	酸化水
20180416	-	-	-	-	-	/	/	/	/
20180921 [▽]	+	+	+	/	/	/	/	/	-
20181011 [▽]	+	+	+	/	/	/	/	/	-
20181128	/	/	/	-	/	-	-	-	/
20181220	-	-	-	-	/	/	/	/	/
20190404	/	/	/	/	/	-	-	-	-
20190704	-	-	-	/	/	-	-	-	-
20191010	/	/	/	/	/	-	-	-	-
20191216	/	/	/	/	/	/	/	- [#]	/
20200520	-	-	-	/	/	-	-	-	-
20200915	/	/	/	/	/	-	-	-	-
20201215	-	-	-	/	/	-	-	-	-
20210331	-	-	-	/	/	-	-	-	-
20210707	/	/	/	/	/	-	-	-	-
20210923 [*]	/	/	/	/	/	+	+	+	-
20211215 [*]	/	/	/	/	/	+	+	+	-
20220323	/	/	/	/	/	-	-	-	-

注:水样1、2、3和6、7、8来自3个终端出水口(分别对应1号、2号微电解仪),水样4来自输水管网回水取样点,水样5来自微电解出水口至输水管网前的取样点。“-”检测结果阴性;“+”检测结果阳性;“/”表示未取样检测(1号微电解仪与2号微电解仪会轮流开启,4号、5号取样点选择性监测);[▽]表示1号微电解仪故障;^{*}表示2号微电解仪故障;[#]是8号终端出水口更换水龙头后的检测。

3 讨论

本中心所用的微电解无菌水系统在跟踪前期的检测结果显示,仅经过超滤的水不能达到无菌,且在微电解仪故障时,所制终端水不能达到无菌;开启微电解仪并正常工作1 h后所制水能达到无菌。国内有学者比较了反渗透实验动物饮用水与高压灭菌水,发现前者不能达到无菌^[2-3]。不能保持所制水无菌的原因可能与反渗透膜、前置超滤膜自身微生物滋生以及输水管道内、终端开口微生物滋生有关。同时,前期的检测水样采用过滤法与国标法(水样未经过滤)的检测结果显示一致,因此在后期的跟踪监测中采用了GB 14925—2010、GB/T 14926.41—2001国家标准推荐的方法。

屏障设施无菌水系统均由灭菌环节、输水管路、供水终端组成。目前,国内应用到屏障设施的无菌水系统主要有反渗透或+浸没式紫外线、超滤(超滤+臭氧发生器+浸没式紫外线)、在线灭菌。反渗透和超滤均是利用膜过滤法进行净化水。反渗透可以截留 9×10^1 道尔顿的小分子,能有效清除溶解于水中的无机物、有机物、细菌、热源等。超滤可以截留相对分子质量在 $1 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$,不能过滤水溶性无机离子,也通常作为反渗透的前置过滤。但反渗透和超滤均需要防止过滤膜被细菌污染或堵塞,需定期监控并更换过滤膜,否则导致过滤失败,系统滋生细菌^[4-5]。也有学者认为,反渗透只可以去除大部分细菌,而不是全部^[6]。同时这2种系统的输水管道以配置成循环管路为佳,而维持输水管路内的无菌则是防止污染的关键点和难点。在线高温灭菌是将水高温灭菌结合降温输送,有文献^[2]报道其可以保持终端出水的无菌,但随着在饮水瓶储存时间延长,滋生细菌逐渐增多,同时能耗较高。微电解是通过改变电场强度,影响细菌的生理代谢而导致其死亡,同时水分子通过微电解发生强的氧化还原反应,并释放活性物质 $[O]$ 、 HO^{2-} 、 H_2O_2 等自由基到循环水中发挥杀菌作用^[1]。微电解的优势是保持循环输水系统持续存在强氧化活性物质而达到灭菌作用,尤其是可以持续保持输水管路的无菌^[1];但将其灌装饮水瓶后能维持多长时间的无菌,尚未做监测。本研究通过对微电解无菌水系统多年的跟踪观察发现,微电解无菌水系统的终端出水口水样检测无菌表明整个无菌水系统无菌;回水口水样无菌表明输水管路无污染;微电解出水口进入供水管网前水样无菌表明微

电解仪器工作正常；而酸化水监测结果保持阴性，是无菌水系统的第二屏障，可弥补无菌水不能实时监测带来的污染风险。

屏障设施无菌水系统的污染环节主要发生在灭菌主机功能减弱或故障、膜过滤或输水循环管路污染、单行无循环管路或供水末端的逆行污染、动物自动饮水嘴的逆行污染。本中心在对微电解无菌水系统的跟踪监测过程中发现，取样点的科学设置非常重要。因此在观察中不仅设置了终端取水点，还设置了循环管路的回水取样点和微电解仪出水口进入管网前的取样点，以此达到对无菌水系统的各关键环节起到准确监控作用。一旦发现污染，可以通过污染取样点位置判断无菌水系统污染发生的具体环节，即准确判断是微电解仪器问题、输水管路问题、终端水逆行污染还是取样操作污染问题。通过几年跟踪观察发现：微电解无菌水系统多以微电解仪发生故障导致杀菌失败，在1号微电解仪工作时2次检测阳性，维修发现电解极片结垢板结，在两极片中形成隔离层，使微电解减弱或不能正常工作。因此，微电解仪的维护非常重要。微电解无菌水系统维护的关键点是：定期清洗除垢，每月一次，每500 L加柠檬酸500 g，开启微电解无菌水系统，使柠檬酸水在系统中循环保持1~2 h，减少矿物质等杂质在电极片上的结垢，保持阴极片、阳极片正常发挥电解作用；过滤膜定期更换，保安过滤每3个月、精过滤膜6个月、超滤膜12个月更换一次。过滤膜的配置起到拦截微量悬浮物和微小杂质颗粒以及部分微生物的作用，可实现水的预处理，减少电极片的结垢，但其不具备自净功能，不能持续保持无菌。经2015—2017年^[1]及近4年来的跟踪监测发现，在微电解系统正常工作时，微电解仪出水口、输水管路、终端出水均没有污染，后期还设置了备用微电解仪器，交替使用，以确保生产屏障设施中动物饮水和日常工作清洁用水的无菌。如没有备用微电解仪且仅有一台微电解仪故障时，应用高压灭菌水替代，以保障屏障设施内动物饮水和日常工作用水符合无菌要求。

屏障设施中动物饮水和日常用水一旦污染将直接导致动物和环境的污染，因此，维持并保持屏障设施无菌水系统的无菌显得极其重要。经过多年跟踪监测的结果表明，微电解无菌水在屏障设施中应用是可行的，但也存在一些关键的细节问题。一方面，无菌水仅仅靠微电解仪尚不能达到持续无菌，输水管路的科学配置是极其关键的因素，必须设置循环回路，使

微电解的杀菌物质在循环管路中持续保持。笔者了解到国内目前约25家实验动物设施使用了微电解无菌水系统，另有2家单位在尝试应用微电解系统时发现所制水不能达到无菌而放弃使用，究其原因是配置的输水管路没有设置循环回路、输水管网有过长过多盲端、输水管网中形成旁通独立闭环等，导致输水管路死角和部分不能循环的水存在，管网中的水不能全部回流而重新进入微电解杀菌循环系统中，从而导致水中细菌的滋生。因此，在实验动物屏障设施的设计规划中，对无菌水系统中输水管路的布局需要考虑循环输水管路的设计，尽可能减少输水死角。另一方面，目前的微电解无菌水系统没有即时报警系统。本中心自2018年11月起在系统中配置了在线微电解仪电流检测表，以监控微电解仪产生的电流，小于或等于2 A时应立即停用，启用备用机。此外，准确判断仍然需要取水样进行微生物检测，历时2~14 d才能报告结果，因此水质微生物检测结果的判断迟于污染发生的实际时间。未来工作中，将考虑利用微电解水中的主要灭菌成分设置在线检测报警系统以达到实时监控的作用。

[作者贡献]

张薇：负责微电解无菌水系统跟踪监测计划制定，统筹安排人员分工，监测结果分析和撰写；

唐彬：负责监测水样的采取，数据收集；

赵勇：负责无菌水系统的维护维修，查阅参考文献；

张志妮：负责水样的检测；

邓新燕：协助水样的检测。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张薇, 唐彬, 黎福荣, 等. 微电解水用于SPF级实验动物饮用水初探[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5):394-398. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.05.013.
- [2] 衣启营, 张凤梅, 高杰, 等. 屏障系统内实验动物饮水4种处理方式的菌落监测比较观察[J]. 医学动物防制, 2017, 33(11):1169-1171.
- [3] 吴金花, 丁琦. 实验动物饮用水机制无菌水与高压灭菌水的对比效果观察[J]. 中国医药导报, 2010, 7(27):28-29. DOI:10.3969/j.issn.1673-7210.2010.27.014.
- [4] 任曙光, 巨英超, 吴建华, 等. 实验动物饮用水系统的建设与维护[J]. 畜牧兽医科技信息, 2014(10):32. DOI:10.3969/J.ISSN.1671-6027.2014.10.018.
- [5] 吴建华, 巨英超, 霍桐树, 等. 实验动物饮用水纯化处理和污染控制[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(20):6665, 6679. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2014.20.051.
- [6] KURTZ D M, FEENEY W P. The influence of feed and drinking water on terrestrial animal research and study replicability[J]. ILAR J, 2020, 60(2):175-196. DOI:10.1093/ilar/ilaa012.

(收稿日期:2021-09-22 修回日期:2022-04-02)

(本文编辑:张俊彦)

实验动物尸体及相关废弃物无害化处置信息化监管系统初探

李 勇, 周 亮, 何 勇, 闫志峰, 王海江

(四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所, 成都 610212)

[摘要] 目前我国尚缺乏针对实验动物尸体及相关废弃物的规范化、制度化管理规范, 对其无害化处置过程也未实现有效的监管, 尤其缺少有效的全过程生物安全监管体系。本研究采用计算机网络、全球卫星定位系统、无线通信、地理信息系统等多学科的前沿技术, 初步建立了一种新型的实验动物尸体及相关废弃物无害化处置信息管理系统, 并与生物安全监管紧密结合, 可以实现全程动态跟踪监控。该系统的建立有利于加强对实验动物尸体及相关废弃物的规范化、制度化监管, 促进医疗废物的安全管控, 防止疾病传播, 保护环境, 保障人体健康。

[关键词] 实验动物尸体; 废弃物; 无害化处置; 生物安全; 信息管理系统

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0122-05

Preliminary Exploration of Information Supervision System for Harmless Disposal of Laboratory Animal Carcasses and Related Wastes

LI Yong, ZHOU Liang, HE Yong, YAN Zhifeng, WANG Haijiang

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212, China)

Correspondence to: WANG Haijiang, E-mail: 4415898@qq.com

[ABSTRACT] At present, there is still a lack of standardized and institutionalized management of laboratory animal carcasses and related wastes in China, and effective supervision of their harmless disposal process, especially an effective whole-process biosafety supervision system. Using computer networks, global satellite positioning systems, wireless communications, geographic information systems and other multidisciplinary cutting-edge technologies, we preliminarily established an information management system for harmless disposal of laboratory animal carcasses and related wastes, which could be closely combined with biosafety supervision to realize dynamic tracking and monitoring in the whole process. The established system can strengthen the standardization and institutionalization management of experimental animal carcasses and related wastes, promote the safety control of medical waste, prevent the spread of diseases, protect the environment and ensure human health.

[Key words] Laboratory animal carcasses; Wastes; Harmless disposal; Biosafety; Information management system

实验动物是指经人工培育, 对其携带微生物和寄生虫实行控制, 遗传背景明确或者来源清楚, 用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的动物^[1]。实验动物为医药卫生事业的发展和人类健康做

出了重大贡献。实验动物尸体是指教学、科研实验中死亡或实验后处死的实验动物, 以及生产、饲养过程中死亡或淘汰的实验动物。废弃物指实验动物生产、饲养和动物实验过程中产生的相关废弃物, 主要包括解剖

[基金项目] 四川省科研院所科技成果转化资金项目: 医药实验感染性废弃物无害化处置(2017YSZH0023)

[作者简介] 李 勇(1975—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: tennisli@163.com

[通信作者] 王海江(1976—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 4415898@qq.com

后的血液、组织液及擦拭物、实验耗材和垫料等^[2-3]。对实验动物尸体及相关废弃物进行无害化处置有利于生物安全和环境保护，也符合动物伦理相关要求。

我国目前对实验动物尸体及相关废弃物缺乏规范化、制度化管理，例如：没有针对实验动物尸体及相关废弃物管理的法规；缺乏集中科学处理的设备、场所；实验人员对处理方法鉴定不明，分类不清，生物安全意识淡薄；政府缺少有效的监管与运行体系等^[4]。因此，如何高效、规范、安全地处理实验动物尸体及相关废弃物，已成为制约我国生命科学教学与科研发展的一个重要因素，也直接关系到人民生命健康、环境卫生、食品安全等社会问题。

为了实现对实验动物尸体及相关废弃物无害化处置的有效监管，本研究团队综合利用计算机网络、全球卫星定位系统、无线通信、地理信息系统等多学科的前沿技术，初步建立了一种可全程动态跟踪监控实验动物尸体及相关废弃物的信息管理系统，以期实现对医药实验过程中所产生各类废弃物进行无害化处置的生物安全监管目标。

1 规范实验动物尸体及相关废弃物的回收和分类流程

实验动物尸体及相关废弃物除动物尸体外，还包括实验动物生产、饲养及动物实验过程中所产生的具有感染性、毒性以及其他危害或潜在危害的废弃物，例如：棉球、棉签、引流棉条、一次性手术衣、纱布及其他各种敷料，一次性卫生用品、一次性实验用品及一次性医疗器械，疾病动物或者受试动物的血液、体液、排泄物及被污染物品，病原体的培养基、标本和菌种，以及实验动物垫料等。废弃物的品种存在多样性，所携带的致病性微生物也存在多样性，因此需要用专用塑料袋进行包装密封，并做好标记，分类存放。其中，具有感染性的实验动物尸体和废弃物，如病原体培养基、标本、菌种等，应消毒灭菌后包装密封于有生物危害标识的专用塑料袋中。一般应设置3种以上颜色的塑料包装袋，便于分类包装，如黄色代表感染性废弃物，黑色代表疑似感染性废弃物，白色代表一般废弃物，如表1所示。废弃物除了用塑料包装袋密封外，还应以贮存桶如带盖的不锈钢桶装载，以便运输^[5]。采用条码技术^[6-7]，通过系统软件自动生成条码并打印，然后粘贴到对应的各类实验动物尸体及相关废弃物包装袋上，如图1所示。

表1 实验动物尸体及相关废弃物的分类包装和标识方式
Table 1 Classified packaging and labeling of laboratory animal carcasses and related wastes

种类	包装方式	标识方式
实验动物尸体	黑色塑料包装袋	条码标识
棉球、棉签、引流棉条、纱布及其他各种敷料	黄色塑料包装袋	条码标识
一次性实验用品及一次性医疗器械	黄色塑料包装袋	条码标识
血液、体液、排泄物及污染物品	黄色塑料包装袋	条码标识
病原体的培养基、标本和菌种	黄色塑料包装袋	条码标识
实验动物垫料	白色塑料包装袋	条码标识



图1 废弃物条码示意图
Figure 1 Bar code of waste

2 实验动物尸体及相关废弃物的信息管理系统的

2.1 信息管理系统的设计内容

采用网际协议的视频监控系统（internet protocol video surveillance, IPVS）技术^[8]，可通过网络数字摄像机和硬盘录像机对现场各种视频进行实时取证录像，在网络畅通情况下实时上传到云服务器平台。在网络中断情况下，通过现场硬盘录像机进行视频图像存储，待网络恢复后自动补传视频图像（图2）。具有权限的工作人员可通过信息管理系统实时调阅查看相关视频。

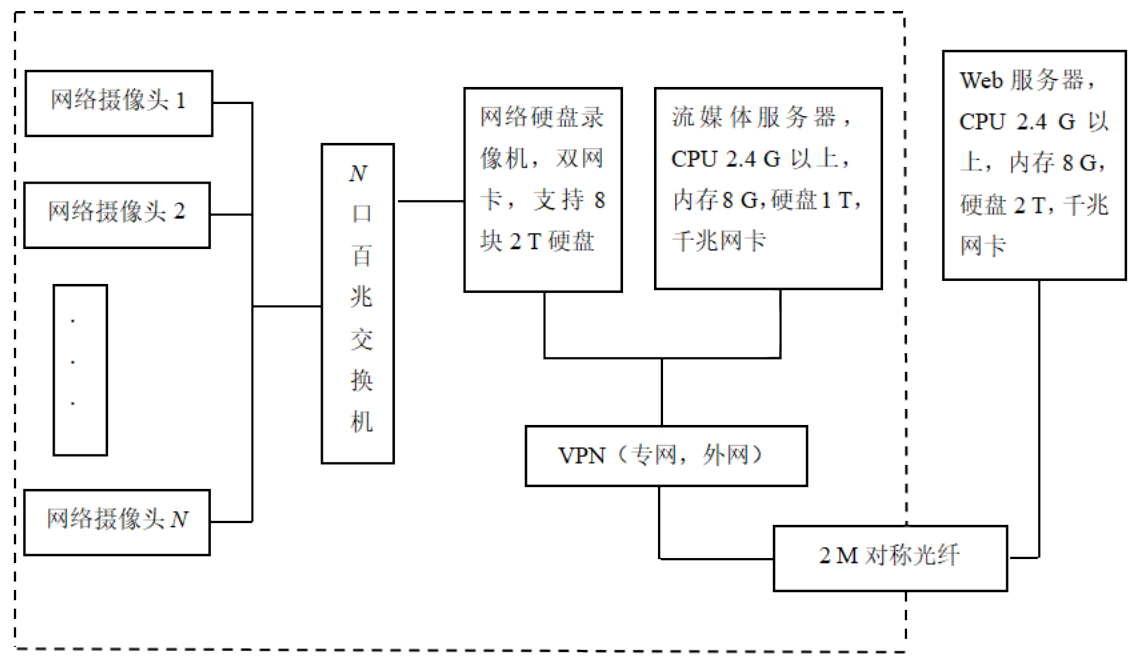
各类实验动物尸体及相关废弃物无害化处置的监管流程包含回收管理、运输过程监管、入库监管、出库监管、处置过程监管、尾气排放监测、废水监测、残留物监测等（图3）。

2.1.1 回收管理

指定权限的工作人员通过扫描设备对粘贴在废弃物包装上的条码进行扫描识别，录入废弃物名称、种类、收集单位、时间、运输车辆等相关信息。

2.1.2 运输过程监管

用配备隔热保温厢体、制冷机组、车厢内温度记录仪等部件的专用感染性废弃物冷藏车对实验动物尸



注：CPU 即中央处理器（central processing unit），VPN 即虚拟专用网络（virtual private network）。

图2 实验动物尸体及相关废弃物无害化处置监管系统的结构图

Figure 2 Structure diagram of supervision system for harmless disposal of laboratory animal carcasses and related wastes

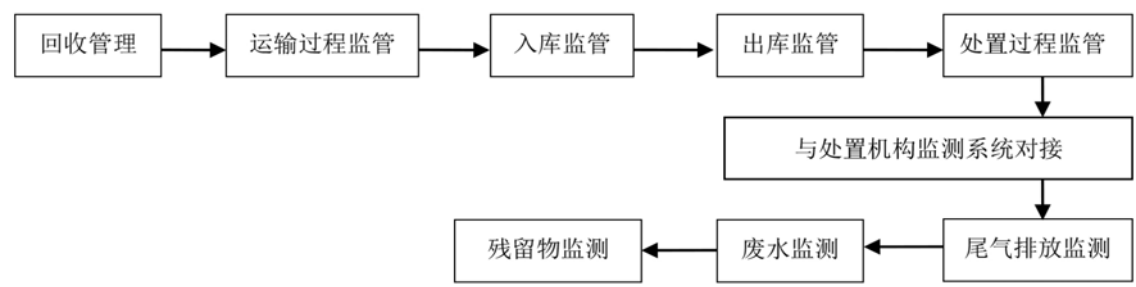


图3 实验动物尸体及相关废弃物无害化处置监管流程图

Figure 3 Flow diagram of harmless disposal supervision of laboratory animal carcasses and related wastes

体及相关废弃物进行全程密封冷藏运输。通过对专用感染性废弃物冷藏车加装GPS的方式，实现对车辆的定位、监控。同时可以调取车辆的历史运行轨迹，做到路线溯源，实现全程监控，保障运输过程中的生物安全。

指定权限的工作人员将运输所需要的资料录入到系统中，并形成相关记录，同时将司机和车辆进行绑定。工作人员还可将封装好的动物尸体拍照，在系统中生成相关档案并留存；同时在进行装袋等操作时全程通过视频监控手段录像，以达到运输过程的全程监管。

2.1.3 出入库监管

指定权限的工作人员通过扫描设备进行出入库操作，并生成相关的出入库记录单据，单据中可体现出入库人员、出入库对象、数量、出入库时间等信息。在出入库过程中，采用视频监控手段进行录像或拍照，并保存视频、图片等证据。

2.1.4 处置过程监管

按照《实验动物 环境及设施》（GB14925-2010）、《实验室生物安全通用要求》（GB19489-2008）标准，对未使用过或仅用作常规科研、检定、检验、教学的实验动物尸体及废弃物，可交由具备《动物防疫条件

合格证》等相关资质的单位,按规定进行集中无害化处置;而接受病原体感染、染毒和放射性实验的实验动物尸体和废弃物,须先行高压灭菌后,再交由具备《危险废物经营许可证》资质且核准经营危险废物处理类别相符的单位集中处置。处置方式采用焚烧法^[9-10],即通过氧化燃烧的方法杀灭病原微生物,将动物尸体及相关废弃物化为灰渣。

指定权限的工作人员通过扫描设备进行销毁操作,并生成相关的销毁记录单据。在整个处置过程中,将重点采用视频监控手段进行全程录像。处置完成后,保存视频资料,并把处置信息传入信息管理系统,以便查阅实验动物尸体及相关废弃物处置情况。

2.1.5 尾气、废水、残留物监测

由于实验动物尸体及相关废弃物处置过程中会产生大量的三废,即废气、废水和固废(残留物),其中含有多有毒有害物质,若处理不当或未达标而排放,会对环境造成危害,破坏生态环境平衡,影响人体健康。

本系统预留有与无害化处置机构自身的监测系统对接的端口,可共享监测系统中采用高灵敏度的传感器采集的尾气、废水等数据信息。残留物经检验合格后可作为土壤添加剂或肥料,也可作填埋处理;处置过程中需进行详细记录,包括处置单位、时间、数量等信息,并采用视频监控手段全程录像。

2.2 信息管理系统的特点

(1) 创新性:利用计算机网络、条码、卫星定位等技术,可实现实验动物尸体及相关废弃物无害化处置全过程的动态监控。(2) 可查性:实验动物尸体及相关废弃物的分类回收、贮存、运输、处置等过程都可以实时录像或拍照,资料可存档,并可随时查阅。(3) 专人负责,杜绝管理漏洞,确保生物安全。

3 思考及讨论

随着医药产业的不断发展,产、学、研过程中产生的各种医药实验废弃物越来越多。然而在高校、研究机构等实验动物频繁使用单位,“重教学科研、轻安全管理”的问题屡见不鲜。比如,生物安全意识欠缺、管理机制落后、实验动物尸体及相关废弃物的有效处理长期被忽视,由此频发实验室生物安全事故,引起社会的广泛关注^[11-13]。实验废弃物的非科学处理主要包含以下几点:(1) 缺乏对实验动物尸体及相关废弃

物的分类回收处理流程的有效监管;(2) 废弃物的生物安全危害等级无法得到有效评估;(3) 无害化处置机构的软硬件建设相对滞后,无害化处置机构忽视实验动物尸体及相关废弃物的潜在生物安全风险。针对以上问题,我国于2020年颁布了《中华人民共和国生物安全法》,并于2021年4月15日起施行,明确生物安全是国家安全的重要组成部分,加强动物防疫,防止动物源性传染病传播是人民健康、社会安定、国家利益的重要保证。因此,无害化处置技术和监管体系应该同步跟上时代的步伐,落实在医疗废物的收集、运送、贮存、处置以及监督管理等活动中。

目前,无害化处置机构多将着眼点放在处置环节,忽视了废弃物的交接、运输及贮存环节,而部分公共生物安全事故的发生恰恰就始于交接、运输及贮存环节中的漏洞,对这三个环节的监管往往没有得到应有的重视。有学者在对浙江省实验动物行政许可单位的调研中发现,部分单位没有详实的废弃物交接记录,应急预案仅侧重于停水停电、设备故障、动物感染等情况^[14]。由于缺乏对交接和转运流程的有效监管,当发生废弃物丢失的情况时,根本无从追溯废弃物下落,使得应急预案成为一纸空文。规范做好实验动物尸体及相关废弃物的分类回收、贮存、标识、预处理,完善交接手续,加强监管等已成为各实验动物相关单位的共识^[15]。

在近年来重大疫病暴发的情况下,从国民生命健康、国家生态安全、经济社会可持续稳步发展的角度出发,组织协调有关力量,开展实验动物相关生物安全防控工作,建立生物安全监测和预警体系,已迫在眉睫^[16]。无害化处置机构必须承担起自身的社会责任,带动行业形成全流程监管体系,为保障生物安全贡献一份力量。

本文阐述了实验动物尸体及相关废弃物信息管理系统的设计思路及预期效果,但目前仍处于研究开发阶段。例如,该系统尚未实现与无害化处置机构监测系统的对接,不能做到信息共享,无法实时了解处置过程中尾气、废水等指标的排放情况;整个系统的运行效果有待观察;还存在单位间沟通衔接不力、信息资源涉及保密等问题,都需要逐步解决。我们相信随着信息管理系统应用于实验动物尸体及相关废弃物无害化处置过程,将进一步完善整条无害化处置产业链的监督管理体系,从而明显提高实验动物尸体及相关废弃物的无害化处置效率,有力保障全过程生物安全。

[作者贡献]

李勇：主持研究，撰写文章；
周亮：提出方案及实施，修改文章；
何勇、闫志峰：共同讨论方案及实施；
王海江：指导方案的实施，审核及修改文章。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 秦川, 谭毅. 医学实验动物学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
- [2] 江涛, 郭姣, 张锦红, 等. 浅谈我院实验动物尸体、废弃物无害化处理的经验[J]. 实验动物科学, 2009, 26(1): 65-66, 69. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2009.01.020.
- [3] 张紫娟, 杜彩霞, 刘沛霖. 我院机能实验室废弃物无害化处理原则与方法[J]. 中医药管理杂志, 2014, 22(3): 466-467. DOI: 10.16690/j.cnki.1007-9203.2014.03.113.
- [4] 周亮, 闫志峰, 李勇, 等. 实验动物尸体无害化处置现状分析[J]. 四川解剖学杂志, 2020, 28(1): 198-200. DOI: 10.3969/j.issn.1005-1457.2020.01.096.
- [5] 翁顺太, 郑立锋, 蔡武卫, 等. 实验动物的废弃物管理[J]. 海峡预防医学杂志, 2007, 13(6): 106-107. DOI: 10.3969/j.issn.1007-2705.2007.06.078.
- [6] 姬飞飞. 条码识别技术及其应用研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学, 2012.
- [7] 张进香. 探究条码技术在医院档案管理中的应用[J]. 办公室业务, 2021(1): 191-192. DOI: 10.3969/j.issn.1004-647X.2021.01.091.
- [8] 高治力. IP 视频监控系统中误码掩盖技术的研究与实现[D]. 西安: 西安电子科技大学, 2012.
- [9] 杨立国, 李传友, 熊波, 等. 动物尸体无害化处理技术应用分析[J]. 农机科技推广, 2014(7): 36-38.
- [10] 张阔, 田枫, 康爱君, 等. 2016年北京地区实验动物废弃物处理方法的调查与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 60-63. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.012.
- [11] 罗银珠, 闽凡贵, 王静, 等. 病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 443-449. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.219.
- [12] 宋国英, 许燕, 朱美霖, 等. 医学院校实验动物及实验室安全培训的实践探索[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 450-454. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.010.
- [13] 董智强, 罗雷, 王玉林, 等. 广州市某高校动物实验室生物安全事件的调查与分析[J]. 医学动物防制, 2010, 26(1): 14-15, 18.
- [14] 胡慧颖, 柯贤福, 施张奎, 等. 浙江省实验动物行政许可单位管理现状及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(5): 67-69. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2013.05.016.
- [15] 张惠芹, 周骥平, 何朝龙, 等. 实验动物尸体处理系统的建立与运行管理[J]. 实验技术与管理, 2017, 34(6): 251-254. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2017.06.063.
- [16] 钱军, 孙玉成. 实验动物与生物安全[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(S1): 15-19, 12.

(收稿日期: 2021-04-02 修回日期: 2021-11-16)

(本文编辑: 富群华, 张俊彦, 赵宇朋)

《中华人民共和国生物安全法》：生物技术研究、开发与应用安全

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过，自2021年4月15日起施行。

第四章 生物技术研究、开发与应用安全

第三十四条 国家加强对生物技术研究、开发与应用活动的安全管理，禁止从事危及公众健康、损害生物资源、破坏生态系统和生物多样性等危害生物安全的生物技术研究、开发与应用活动。从事生物技术研究、开发与应用活动，应当符合伦理原则。

第三十五条 从事生物技术研究、开发与应用活动的单位应当对本单位生物技术研究、开发与应用的安全负责，采取生物安全风险防控措施，制定生物安全培训、跟踪检查、定期报告等工作制度，强化过程管理。

第三十六条 国家对生物技术研究、开发活动实行分类管理。根据对公众健康、工业农业、生态环境等造成危害的风险程度，将生物技术研究、开发活动分为高风险、中风险、低风险三类。生物技术研究、开发活动风险分类标准及名录由国务院科学技术、卫生健康、农业农村等主管部门根据职责分工，会同国务院其他有关部门制定、调整并公布。

第三十七条 从事生物技术研究、开发活动，应当遵守国家生物技术研究开发安全管理规范。从事生物技术研究、开发活动，应当进行风险类别判断，密切关注风险变化，及时采取应对措施。

第三十八条 从事高风险、中风险生物技术研究、开发活动，应当由在我国境内依法成立的法人组织进行，并依法取得批准或者进行备案。从事高风险、中风险生物技术研究、开发活动，应当进行风险评估，制定风险防控计划和生物安全事件应急预案，降低研究、开发活动实施的风险。

第三十九条 国家对涉及生物安全的重要设备和特殊生物因子实行追溯管理。购买或者引进列入管控清单的重要设备和特殊生物因子，应当进行登记，确保可追溯，并报国务院有关部门备案。个人不得购买或者持有列入管控清单的重要设备和特殊生物因子。

第四十条 从事生物医学新技术临床研究，应当通过伦理审查，并在具备相应条件的医疗机构内进行；进行人体临床研究操作的，应当由符合相应条件的卫生专业技术人员执行。

第四十一条 国务院有关部门依法对生物技术应用活动进行跟踪评估，发现存在生物安全风险的，应当及时采取有效补救和管控措施。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)



吕毅, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 享受国务院特殊津贴专家。现任西安交通大学副校长, 西安交通大学第一附属医院院长、党委副书记, 精准外科与再生医学国家地方联合工程研究中心主任。兼任教育部临床医学类专业教学指导委员会副主任委员、教育部科学技术委员会交叉科学与未来技术专门委员会委员、中国医师协会智慧医疗专委会副主任委员、中国电工技术学会生物电工专业委员会副主任委员、中国医学装备协会磁外科创新专家委员会主任委员、中华医学会外科手术学组副组长等。主要研究领域是医工结合外科(“磁外科”)技术创新及医疗设备研发、新型生物材料应用、终末期肝病肝脏移植、肝胆胰肿瘤综合治疗、现代医学教育等。以第一完成人获得国家科技进步二等奖、中华医学科技奖、教育部技术发明奖及陕西省科学技术一等奖等。主持科技部重点研发计划、国家自然科学基金-国家重大科学仪器研制重点项目等近30项。在 *Annals of Surgery*、*Hepatology* 等发表SCI论文337篇。授权国家发明专利55项, 软件著作权1项, 申请美国专利1项。

部重点研发计划、国家自然科学基金-国家重大科学仪器研制重点项目等近30项。在 *Annals of Surgery*、*Hepatology* 等发表SCI论文337篇。授权国家发明专利55项, 软件著作权1项, 申请美国专利1项。

适用于微创消融治疗研究的小鼠胰腺癌原位模型建立方法及比较

毛璐婧^{1,2,3}, 张娜娜^{1,2,3}, 刘 昊⁴, 史爱华^{2,3}, 朱子语⁴, 吕 毅^{1,2,3,5}

(1. 西安交通大学第一附属医院Med-X研究院再生与重建医学研究所, 西安 712000; 2. 西安交通大学第一附属医院精准外科与再生医学国家地方联合工程研究中心, 西安 710061; 3. 西安交通大学第一附属医院陕西省再生医学与外科工程研究中心, 西安 710061; 4. 西安交通大学医学部, 西安 710061; 5. 西安交通大学第一附属医院肝胆外科, 西安 710061)

[摘要] **目的** 探究应用肿瘤细胞原位注射和肿瘤组织块移植法建立小鼠胰腺癌原位模型的优缺点, 为以精准消融治疗研究为目的的小鼠胰腺癌原位模型的建立提供技术参考。**方法** 取20只6~8周龄的健康雄性C57BL/6小鼠, 分为4组, 每组5只: A组采用小鼠胰腺癌Panc02细胞悬液直接注射法; B组采用含基质胶的小鼠胰腺癌Panc02细胞悬液注射法; C组采用小鼠胰腺癌组织块移植法; D组采用小鼠肿瘤组织块水凝胶粘接法。术后观察各组小鼠胰腺癌的成瘤率、肿瘤大小、腹腔脏器粘连程度和肿瘤转移情况, 分别采用HE染色法和免疫组织化学法检测肿瘤组织形态学变化以及Ki67和 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达差异。**结果** A、B、C、D四组小鼠胰腺癌成瘤率分别为60%、80%、100%和100%。建模16 d后, A组小鼠肿瘤体积为 $(47.80 \pm 42.99) \text{ mm}^3$, 均质性差; B、C与D组小鼠肿瘤体积分别为 $(68.43 \pm 16.77) \text{ mm}^3$ 、 $(105.86 \pm 17.25) \text{ mm}^3$ 和 $(128.98 \pm 13.41) \text{ mm}^3$, 比A组明显增大($P < 0.01$), 且均质性较好。A组小鼠腹腔重度粘连率为100%, B组重度粘连率为80%, C组与D组均未出现重度腹腔粘连。A组小鼠肿瘤转移率为100%, B组转移率为60%, C组与D组小鼠均未发现肿瘤转移。4组小鼠的肿瘤在组织学上无明显差异, 且肿瘤组织中Ki67和 α -SMA蛋白的相对表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 采用肿瘤组织块移植法及水凝胶粘接法建立小鼠胰腺癌原位模型的成瘤率高, 转移少, 腹腔粘连轻, 且未改变肿瘤细胞的生物学特性, 易于操作和普及, 造模效果更好。

[关键词] 胰腺癌; 原位模型; 原位注射; 肿瘤移植; 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0127-08

[基金项目] 科技部重点研发计划项目: 电磁声光耦合式无创消化道早癌陡脉冲电场消融系统研制(2018YFC0115300); 国家自然科学基金-重大科学仪器研制项目: ERCP联合高压脉冲电厂微创肝胆胰肿瘤精准治疗工作站的研制(81727802)

[作者简介] 毛璐婧(1997—), 女, 本科, 实验技术员, 研究方向: 肿瘤免疫与免疫治疗。E-mail: 609922049@qq.com

[通信作者] 吕 毅(1963—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 医工结合外科技术创新、医疗设备研发、新型生物材料应用, 以及以手术为主的肝胆胰肿瘤综合治疗。E-mail: luyi169@126.com

Establishment and Comparison of Mouse Pancreatic Cancer Orthotopic Model for Minimally Invasive Ablation Therapy Study

MAO Lujing^{1,2,3}, ZHANG Nana^{1,2,3}, LIU Hao⁴, SHI Aihua^{2,3}, ZHU Ziyu⁴, LÜ Yi^{1,2,3,5}

(1. Center for Regenerative and Reconstructive Medicine, Med-X Institute of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 712000, China; 2. National Local Joint Engineering Research Center for Precision Surgery & Regenerative Medicine, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Shaanxi Province Center for Regenerative Medicine and Surgery Engineering Research, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 4. Health Science Center of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 5. Department of hepatobiliary surgery, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Correspondence to: LÜ Yi, E-mail: luyi169@126.com

[ABSTRACT] Objective To explore the advantages and disadvantages of orthotopic mouse model of pancreatic cancer established by orthotopic injection of tumor cells and transplantation of tumor tissue block, in order to provide technical reference for the establishment of orthotopic mouse model of pancreatic cancer with the purpose of precision ablation treatment. **Methods** A total of twenty healthy aged 6-8 weeks male C57BL/6 mice were divided into four groups, with five mice per group. Direct injection of mouse pancreatic cancer Panc02 cell was used in group A, direct injection of mouse pancreatic cancer Panc02 cell (containing matrigel) was used in group B, tumor tissue block transplantation of mouse pancreatic cancer was used in group C, the tumor tissue block hydrogel bonding method was used in group D. The tumor formation rate, tumor size, the degree of abdominal organ adhesion, tumor metastasis were observed after surgery in each group of mice. Tumor histomorphology and expressions of Ki67 and α -smooth muscle actin (α -SMA) protein were detected by HE staining and immunohistochemistry, respectively. **Results** The tumor formation rates in groups A, B, C, and D were 60%, 80%, 100%, and 100% respectively. After modeling for 16 d, the tumor volume of mice in group A was $(47.80 \pm 42.99) \text{ mm}^3$, with poor homogeneity. The tumor volume of mice in groups B, C and D [$(68.43 \pm 16.77) \text{ mm}^3$, $(105.86 \pm 17.25) \text{ mm}^3$, $(128.98 \pm 13.41) \text{ mm}^3$, respectively] was significantly larger than that in group A ($P < 0.01$), with better homogeneity. The severe abdominal adhesion rate in group A mice was 100% and 80% in group B, and no severe abdominal adhesions occurred in groups C and D. The metastasis rate was 100% in group A and 60% in group B, and no tumor metastases were found in mice in groups C and D. There was no difference in the tumor formation of the four groups of mice, and no significant difference in the expression of Ki67 and α -SMA proteins in the tumor tissues ($P > 0.05$). **Conclusion** The establishment of orthotopic pancreatic cancer in mice by tumor tissue transplantation and hydrogel adhesion has the advantages of high tumor formation rate, less metastasis, mild adhesion of abdominal cavity, no change in the biological characteristics of tumor cells, easy operation and popularization, and better modeling effect.

[Key words] Pancreatic cancer; Orthotopic model; Orthotopic injection; Tumor transplantation; Mice

胰腺癌因恶性程度高，患者生存期短，被称为“癌症之王”。全球最新癌症数据统计分析显示，胰腺癌发病率占恶性肿瘤的2.6%，而死亡率高达4.7%^[1]，且绝大部分患者在诊断为胰腺癌后半年内死亡，5年生存率约为10%^[2]。胰腺癌因具有高度纤维化的肿瘤间质，放化疗、分子靶向药物和免疫疗法均对其治疗效果欠佳^[3]。近年来，随着CT、超声等影像技术的进步，局部选择性破坏肿瘤组织的物理消融疗法为胰腺癌患者带来了良好的治疗前景^[4]。研究表明，微创消

融疗法可显著延长进展期胰腺癌患者的总生存期^[5]。而各种物理消融方法在用于胰腺癌治疗的过程中仍存有一些问题，如热消融引起的热沉效应，消融效果不彻底，以及如何联合其他治疗方案等，均需要进一步的实验探究。

建立小鼠胰腺癌移植瘤模型是胰腺癌研究的重要基础。目前主要的造模方法有皮下移植瘤模型及原位移植瘤模型等。皮下移植瘤生长时易被纤维包绕，肿瘤血管生成易受干扰，不能很好地模拟人胰腺癌真实

情况,有一定的局限性^[6]。而原位胰腺癌模型是胰腺癌研究中较为理想的一种,为探究胰腺癌原位消融治疗方案等提供了合理的动物模型。因物理消融是肿瘤局部消融,对原位胰腺癌模型的要求较高,如肿瘤模型同质性差(肿瘤体积差异大)、腹腔脏器粘连严重、腹腔转移等均会影响肿瘤消融效果。目前,关于小鼠原位胰腺癌模型建立的研究报告较少。因此,如何高效准确地建立具有较高同质性的小鼠原位胰腺癌模型对于探究胰腺癌治疗方案具有重要意义。本研究对比分析了应用肿瘤细胞原位注射法以及肿瘤组织块移植法建立小鼠原位胰腺癌模型的优缺点,并总结建模过程中遇到的相关问题和解决方案,以期小鼠胰腺癌原位模型的建立提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及其培养

小鼠胰腺癌细胞系 Panc02 购自河北北纳生物科技有限公司,用含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 青链霉素的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次。细胞单层贴壁生长,约 80% 融合时使用胰蛋白酶消化传代。

1.2 实验试剂及其配制

DMEM 高糖培养液、胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司;体积分数为 0.25% 的胰蛋白酶、青链霉素购自上海碧云天生物技术有限公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;兔抗 Ki67 一抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;鼠抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗购自北京兰杰柯科技有限公司(Biosharp 品牌)。DAB 显色试剂盒(20 $\times$)和改良 Harris 苏木精染色液购自北京索莱宝科技有限公司。

水凝胶为本实验室制备的双网络强韧水凝胶,由丙烯酰胺单体(3.6 g)、海藻酸钠(0.6 g)和去离子水(30 g)按照原料配比 6:1:50 制备所得。壳聚糖溶液的制备:首先将 0.976 g 吗啉乙磺酸加入 50 g 去离子水中,并通过逐滴加入质量比为 1:10 的 NaOH 溶液调节 pH 值约为 4.5,然后加入 1 g 壳聚糖并搅拌至完全溶解。粘接肿瘤组织前,将 12 g/L 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和 12 g/L 的 N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)加入之前配制好的壳聚糖溶液中,作为胶水用来粘接肿瘤组织与水凝胶。待粘接组

织和强韧水凝胶中的羧基与壳聚糖链中带正电的氨基反应生成酰胺键,同时分子链之间还存在着氢键和静电相互作用,从而形成牢固粘接。该水凝胶已被证实具有良好的生物安全性,在起到物理粘接作用的同时还可以减轻炎症反应^[7]。壳聚糖则能有效防止肿瘤组织与周围组织粘连的发生,促进创面的修复与愈合^[8]。

1.3 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只,雄性,6~8 周龄,体质量为(20 $\pm$ 3) g,由西安交通大学医学部实验动物中心[SCXK(陕)2018-001]提供,质量合格证号为 1439。实验小鼠在西安交通大学医学部实验动物中心[SYXK(陕)2020-005]屏障环境中饲养管理,环境温度维持在(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度控制在 50%~80%,光照时间 12 h,动物可自由进食、饮水。动物饲养、管理和实验操作严格按照国家和学校有关实验动物管理方面的规定进行,实验方案经西安交通大学动物伦理委员会批准[2018 伦审科字第 G-196 号]。

1.4 小鼠原位胰腺癌模型建立

1.4.1 细胞悬液直接注射法

该方法定义为实验 A 组,随机取 5 只小鼠。将培养好的小鼠胰腺癌 Panc02 细胞系消化并吹打,制备成单细胞悬液,PBS 洗涤 1 次,生理盐水(即 0.9% NaCl 溶液)洗涤 2 次,细胞计数板计数,生理盐水稀释细胞至 $1\times 10^7/100\ \mu\text{L}$ 。用异氟烷麻醉小鼠后,在小鼠左侧肋下部位用脱毛膏脱毛,消毒腹部备皮,逐层打开小鼠腹腔,首先寻找脾脏位置,在胃与脾脏之间连接紧密的类似脂肪组织的部分即为小鼠胰腺。用无菌胰岛素注射器将制备好的细胞悬液 20 $\mu\text{L}/\text{只}$ (2×10^6 个/只)接种于小鼠胰腺原位,棉签轻按注射部位约 30 s 后,将小鼠腹部器官归位,逐层缝合腹部。每隔 2 d 观察小鼠肿瘤生长情况,记录小鼠体质量。

1.4.2 含基质胶的细胞悬液注射法

该方法定义为实验 B 组,随机取 5 只小鼠。采用含 50% Matrigel 基质胶的生理盐水混悬小鼠胰腺癌 Panc02 细胞,采用与 1.4.1 节中同样的方法进行接种及观察。

1.4.3 肿瘤组织块移植法

该方法定义为实验 C 组,随机取 5 只小鼠。根据预实验的结果可知,按 1.4.1 节肿瘤细胞悬液直接注射到小鼠胰腺原位后第 10 天时,即可在小鼠左上腹部(即胰腺在体表的投影部位)触及质硬的包块;于第 14 天时开腹剥离肿瘤的长径约 5~7 mm,第 21 天时肿瘤长

径约7~10 mm, 此时肿瘤组织活力好, 内部无坏死, 因此取接种后第21天的肿瘤组织作为肿瘤组织块移植建立胰腺癌模型的“瘤组织源”。将采用细胞悬液直接注射法形成的任意一只荷瘤小鼠脱颈处死, 浸泡在75%乙醇溶液中约20 min, 逐层打开小鼠腹腔将小鼠胰腺及肿瘤组织均取出, 将肿瘤组织剥离, 用组织剪剪成1 mm³的肿瘤组织块, 无菌PBS冲洗2次, 放在DMEM培养液中待用。异氟烷麻醉新的待接种小鼠后取右卧位, 用组织剪在小鼠左侧肋下做一切口, 找到脾脏后顺着脾门找到胰腺, 将胰腺充分暴露并摊平, 使用7-0可吸收缝线将1 mm³肿瘤小块缝入胰腺组织上, 将小鼠腹部器官归位, 逐层缝合腹部。每隔2 d观察小鼠肿瘤生长情况, 记录小鼠体质量。

1.4.4 肿瘤组织块水凝胶粘接法

该方法定义为实验D组, 随机取5只小鼠。同1.4.3节方法, 用手术剪将由细胞悬液直接注射法获得的小鼠肿瘤组织剪成1 mm³的肿瘤组织块待用。接种时, 剪开胰腺包膜约1 mm, 将水凝胶浸入壳聚糖溶液中, 将肿瘤组织块置于水凝胶上, 将负载肿瘤组织块的水凝胶粘附于胰腺组织上, 按压约60 s。将小鼠腹部器官归位, 逐层缝合腹部。每隔2 d观察小鼠肿瘤生长情况, 记录小鼠体质量。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 手术时长及术后小鼠一般情况

计算从开腹手术开始计时至完全完成关腹的时间, 即手术时长。然后在建模后前2 d, 每天观察小鼠的饮水、进食及活动情况; 之后每2 d观察一次, 并称量小鼠体质量。

1.5.2 肿瘤生长和大小测定

于接种后肿瘤生长16 d时, 脱颈处死小鼠, 观察成瘤情况。从各组小鼠胰腺组织中均可找到肉眼可辨认的肿瘤组织, 其质韧, 呈灰白色, 凸出于胰腺组织生长。统计各组小鼠的成瘤率。然后剥离移植瘤, 用游标卡尺测量并记录肿瘤最长径(a)和最短径(b)。肿瘤大小以肿瘤体积(V/mm^3)表示, 按公式 $V=a \times b^2/2$ 计算。

1.5.3 腹腔脏器粘连程度的分级判定

在文献[9]的基础上改进, 设立等级分级法。0级: 完全无粘连。Ⅰ级: 胰腺肿瘤组织与内脏组织有点状或膜状粘连, 或肿瘤组织与腹壁或内脏之间有一条粘连带, 分离钳容易分离且无出血。Ⅱ级: 胰腺肿瘤组织与内脏或腹壁间有两条粘连带, 可分离且出血少,

内脏器官无损伤。Ⅲ级: 胰腺肿瘤组织与内脏或腹壁间有多于两条的粘连带, 分离困难且出血多, 内脏器官外膜及包膜层可出现损伤。Ⅳ级: 胰腺肿瘤组织与其他内脏器官纠集成团, 与腹壁粘连紧密, 分离很困难, 强行分离可致内脏器官撕裂。0~Ⅱ级为轻度粘连; Ⅱ~Ⅳ级为重度粘连。

1.5.4 肿瘤转移情况判断

将各组小鼠中除胰腺外的其他脏器(肝、肠、胃、肾与脾)均分离取出, 仔细观察有无转移灶的形成。

1.5.5 HE染色法观察肿瘤组织形态学变化

将取出的肿瘤组织经脱水、包埋、切片后进行HE染色, 然后光学显微镜下观察肿瘤组织病理学形态特点。具体染色方法参见改良Harris苏木精染色液说明书, 显微镜观察的放大倍数为400倍。

1.5.6 免疫组织化学法检测Ki67和 α -SMA表达

将取出的肿瘤组织经常规脱水、包埋、切片后, 采用免疫组织化学法检测Ki67表达水平, 以此评估肿瘤细胞的增殖情况; 检测 α -SMA表达水平, 以此了解肿瘤间质中肿瘤相关成纤维细胞所占比例。具体按照免疫组化SP三步法^[10]进行检测; 一抗的工作液体积稀释比例为1:150, 4℃孵育过夜; 二抗的工作液体积稀释比例为1:150, 37℃孵育30 min; DAB显色15 min。选择10个高倍视野进行半定量结果判定。细胞不着色记0分, 染淡黄色记1分, 棕黄色记2分, 棕褐色记3分。采用Image J软件评估着色细胞百分率, 并据此判定蛋白表达结果: $\leq 5\%$ 为阴性, 记0分; 5%~25%为弱阳性, 记1分; 26%~50%为中等阳性, 记2分; 51%~75%为阳性, 记3分; $\geq 75\%$ 为强阳性, 记4分。

1.6 统计学分析

采用SPSS 22.0软件对所有实验数据进行统计分析。计量结果用 $\bar{x} \pm s$ 显示, 计数结果用 $n(\%)$ 表示。率的比较采用卡方检验。多组间均数比较采用方差分析, 组内两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ (双侧检验)认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原位胰腺癌模型小鼠的手术时长和一般情况

4种手术方法的手术时长记录为表1, 其中肿瘤组织块水凝胶粘接法的手术时间最短($P=0.009$)。在建模手术后第2天直至第16天, 4组20只小鼠均可正常饮水、进食, 活动力良好, 而且各组小鼠的体质量呈

现逐渐增加的趋势(图1A)。

2.2 小鼠成瘤率、肿瘤大小

用细胞悬液直接注射(A组)或含基质胶的细胞悬液注射(B组)后小鼠原位胰腺癌成瘤率分别为60%与80%,而用肿瘤组织块移植(C组)及肿瘤组织块水凝胶粘接移植(D组)后小鼠原位胰腺癌成瘤率均为100%(表1)。各组小鼠的剥离肿瘤见图1B,可

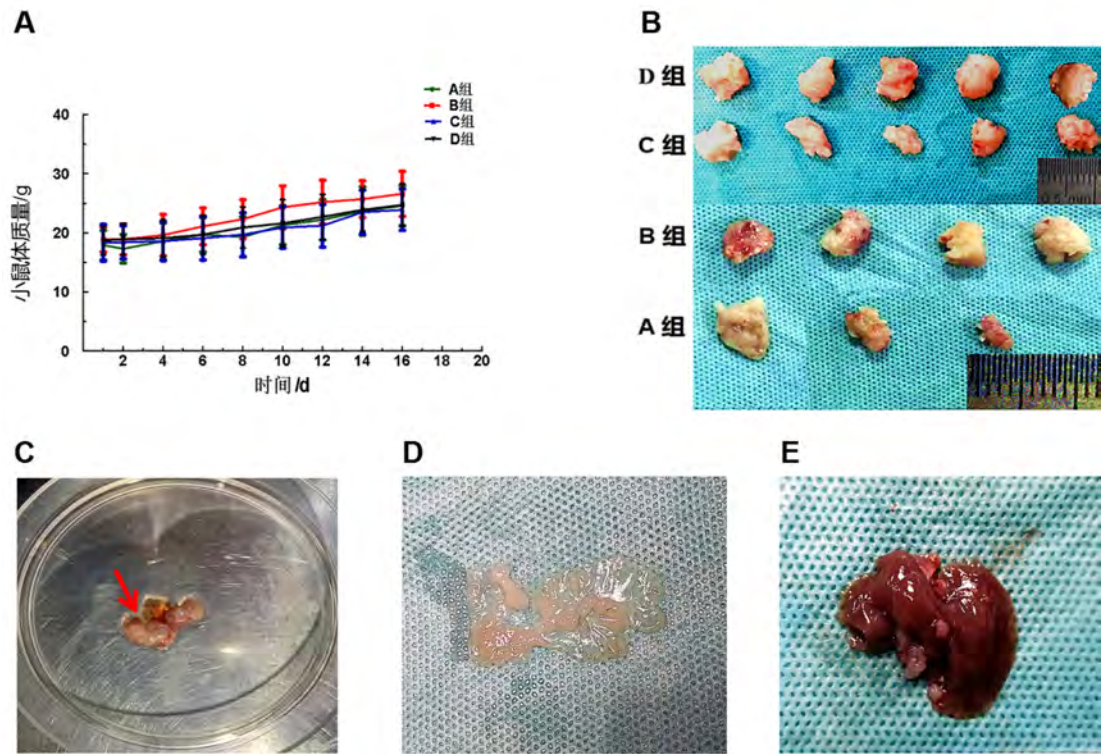
见A组小鼠肿瘤体积大小不一,均质性差;B、C与D组小鼠肿瘤体积大小接近,均质性较好。另外,A、B组小鼠肿瘤组织因与周围组织粘连严重,肿瘤组织表面粗糙;C、D组肿瘤组织表面较光滑。而且D组的肿瘤组织体积较大($P=0.001$),剖开肿瘤切面,可见水凝胶未完全降解(图1C)。4组小鼠的肿瘤平均体积见表1。

表1 4组小鼠胰腺原位癌成瘤率比较

Table 1 Comparison of tumor formation rate of pancreatic carcinoma *in situ* among the four groups of mice

指标	A组(n=5)	B组(n=5)	C组(n=5)	D组(n=5)
手术平均时间/min, $\bar{x}\pm s$	12.80 $\pm$ 2.05	13.20 $\pm$ 1.48	12.60 $\pm$ 1.14	9.20 $\pm$ 2.17
原位胰腺癌形成数(率), n (%)	3(60)	4(80)	5(100)	5(100)
肿瘤平均体积/mm ³ , $\bar{x}\pm s$	47.80 $\pm$ 42.99	68.43 $\pm$ 16.77	105.86 $\pm$ 17.25	128.98 $\pm$ 13.41

注:A组采用小鼠胰腺癌Panc02细胞悬液直接注射法;B组采用含基质胶的小鼠胰腺癌Panc02细胞悬液注射法;C组采用小鼠胰腺癌组织块移植法;D组采用小鼠肿瘤组织块水凝胶粘接法。



注:A图示各组小鼠的体质量变化趋势;B图示各组肿瘤大小形态比较;C图示D组肿瘤切面;D图示A组肿瘤肠系膜转移情况;E图示A组肿瘤肝转移情况。A组采用小鼠胰腺癌Panc02细胞悬液直接注射法;B组采用含基质胶的小鼠胰腺癌Panc02细胞悬液注射法;C组采用小鼠胰腺癌组织块移植法;D组采用小鼠肿瘤组织块水凝胶粘接法。

图1 各组胰腺癌原位模型小鼠的生长情况及剥离肿瘤情况

Figure 1 Growth and tumor dissection of pancreatic cancer orthotopic model mice in each group

2.3 小鼠腹腔脏器粘连程度和肿瘤转移情况

各组小鼠腹腔粘连程度统计见表2。A组小鼠腹腔重度粘连率为100%,B组小鼠腹腔重度粘连率为80%,C组与D组均未出现重度腹腔粘连。各组小鼠肿瘤腹

腔转移情况见表3。A组小鼠转移率最高为100%,其中2例为肠系膜转移(图1D),2例为肝转移(图1E),1例为胃转移;B组小鼠转移率为60%,2例为肝转移,1例为肠系膜转移;C、D组小鼠未发现转移瘤。

表2 各组小鼠肿瘤腹腔粘连等级比较

Table 2 Comparison of abdominal adhesion grade among the four groups

	[n (%)]			
粘连等级	A组 (n=5)	B组 (n=5)	C组 (n=5)	D组 (n=5)
0级	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
I级	0 (0)	0 (0)	2 (40)	3 (60)
II级	0 (0)	1 (20)	3 (60)	2 (40)
III级	3 (60)	3 (60)	0 (0)	0 (0)
IV级	2 (40)	1 (20)	0 (0)	0 (0)

注: A组采用小鼠胰腺癌 Panc02 细胞悬液直接注射法; B组采用含基质胶的小鼠胰腺癌 Panc02 细胞悬液注射法; C组采用小鼠胰腺癌组织块移植法; D组采用小鼠肿瘤组织块水凝胶粘接法。

表3 各组小鼠腹腔转移情况比较

Table 3 Comparison of intraperitoneal metastasis among the four groups

	[n (%)]			
转移脏器	A组 (n=5)	B组 (n=5)	C组 (n=5)	D组 (n=5)
脾脏	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
肝脏	2 (40)	2 (40)	0 (0)	0 (0)
肠系膜	2 (40)	1 (20)	0 (0)	0 (0)
胃	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
肾脏	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

注: A组采用小鼠胰腺癌 Panc02 细胞悬液直接注射法; B组采用含基质胶的小鼠胰腺癌 Panc02 细胞悬液注射法; C组采用小鼠胰腺癌组织块移植法; D组采用小鼠肿瘤组织块水凝胶粘接法。

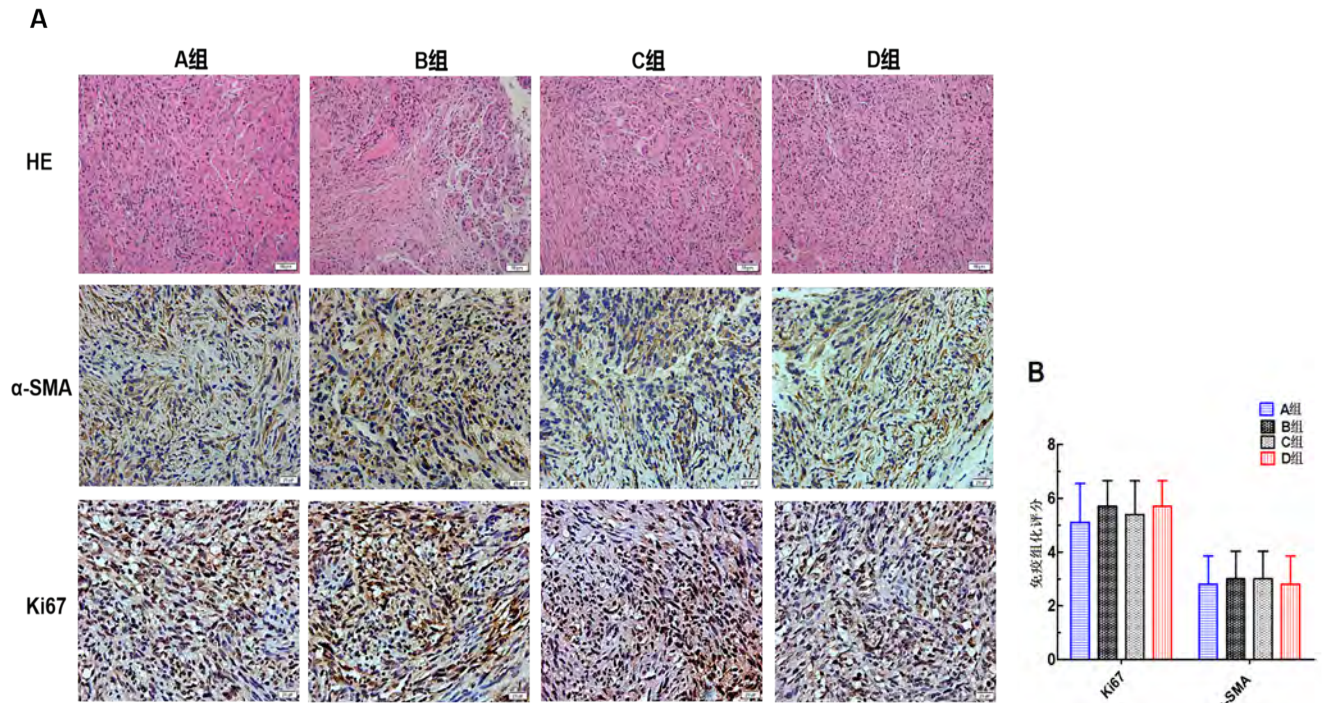
2.4 肿瘤组织形态学特点

HE 染色 (图 2A) 显示 4 组小鼠原位胰腺癌的病理组织形态学特点, 发现移植瘤在组织学上无显著差异。肿瘤细胞均呈现低分化, 细胞核不规则且缺乏极性, 核仁多呈分叶状, 肿瘤细胞对周围正常胰腺组织有显著的侵袭性, 肿瘤间质具有大量肿瘤相关成纤维细胞。

免疫组织化学染色 (图 2A) 显示, Ki67 与 α -SMA

在 4 组小鼠肿瘤组织中均呈现阳性表达, 提示胰腺癌细胞增殖活跃、肿瘤间质高度纤维化、侵袭性强等生物学特点。图 2B 统计显示 Ki67 和 α -SMA 在 4 组小鼠肿瘤组织中的相对表达水平无明显差异 ($P_{\text{Ki67}}=0.619$, $P_{\alpha\text{-SMA}}=0.946$), 表明上述 4 种原位胰腺癌建模法所形成的肿瘤组织均具有胰腺癌生物学特性。

此外, C 与 D 组肿瘤组织中可吸收缝合线及水凝胶均未被完全降解, 在水凝胶局部有轻度的炎症反应。



注: A组采用小鼠胰腺癌 Panc02 细胞悬液直接注射法; B组采用含基质胶的小鼠胰腺癌 Panc02 细胞悬液注射法; C组采用小鼠胰腺癌组织块移植法; D组采用小鼠肿瘤组织块水凝胶粘接法。HE 染色图中比例尺大小为 50 μm , 免疫组织化学染色图中比例尺大小为 20 μm 。

图2 HE 染色法和免疫组织化学法 (DAB 染色) 分别检测各组小鼠原位胰腺癌形态组织特点及 Ki67 和 α -SMA 表达情况

Figure 2 Tumor histomorphology and the expressions of Ki67 and α -SMA proteins were detected by HE staining and immunohistochemistry, resp (DAB staining)

3 讨论

局部物理消融对胰腺癌的治疗具有很好的应用前景,但由于消融后肿瘤复发率偏高,限制了其在临床肿瘤治疗领域的广泛应用^[11-12]。肿瘤原位消融对胰腺癌模型的要求较高,因其为局部消融,肿瘤应具有良好的均质性;此外,模型建立过程中所致的种植性转移可显著影响预后。小鼠原位胰腺癌模型能够为探究胰腺癌消融治疗效果以及其他治疗方案提供很好的研究基础。Tan等^[13]首先将人胰腺癌细胞株 AsPC-1 注射于裸鼠胰腺十二指肠叶,以此建立胰腺癌细胞悬液的裸鼠原位种植模型。Liu等^[14]将人胰腺癌手术标本剪成小瘤块,直接种植于 BALB/c-nu/nu 裸小鼠的胰腺被膜下。Huynh等^[15]利用超声将胰腺癌细胞注入主胰管建立模型,避免了种植性转移。Tsuji等^[16]利用荧光蛋白标记胰腺癌细胞并注入小鼠胆总管,成功建立肿瘤模型。前两种方法是目前建立小鼠胰腺癌原位模型的主要方法,但存在诸多缺陷,如前者易造成人为的种植性转移,后者则操作复杂、对胰腺损伤较大。

据此,本研究分别探究了肿瘤细胞原位注射法和肿瘤组织块移植法建立小鼠原位胰腺癌模型的优缺点,并分析了各种方法在建立过程中遇到的相关问题,提出了解决方案。肿瘤细胞原位注射法建立模型快速,操作简单,但由于胰腺包膜极薄,单纯的细胞悬液在注射及回纳脏器的过程中,细胞悬液容易渗出而影响建模效果,导致小鼠胰腺癌成瘤率低且易发生转移。值得注意的是,此处的腹腔转移并非传统意义上的肿瘤转移,而是由于肿瘤细胞悬液直接注射法易致细胞外渗引起的种植性转移。因此,在 A 组小鼠模型中,腹腔转移率可高达 100%,而成瘤率仅为 60%;此外,肿瘤大小不均,肿瘤组织与周围组织粘连严重。高发的腹腔转移严重影响荷瘤小鼠的生存预后。肿瘤大小不均导致胰腺癌消融治疗效果存在显著差异。肿瘤组织与周围组织粘连严重,导致消融损伤正常组织,引起荷瘤小鼠的预后差异,影响胰腺癌消融治疗效果的可靠性。总之,低成瘤率和高发的腹腔转移主要是因为胰腺组织包膜极薄,且周围有许多实质性器官和血管,关腹时发生的挤压导致 Panc02 细胞混悬液流入腹腔,容易形成种植性的播散转移。

本研究对单纯细胞悬液注射方法进行了改进,即把基质胶加入 Panc02 细胞混悬液后注射入小鼠胰腺,

建立原位胰腺癌模型。采用此方法后,胰腺癌成瘤率提升至 80%,转移率减少至 60%,形成的肿瘤均质性较好,但仍与周围组织粘连严重,重度粘连率高达 80%。由于胰腺位置深、周围有许多重要器官和大血管等解剖特点,手术后易发生腹腔内组织器官粘连。而常见的热消融、非热消融(纳米刀)在局部肿瘤消融过程中释放热辐射以及高压脉冲电场,均会对正常组织器官造成严重损伤,因此在实验过程中,常需将负荷肿瘤组织的胰腺分离迁出腹腔进行消融治疗。所以,以探究肿瘤原位消融疗效为目的建立原位胰腺癌模型时,避免腹腔内组织器官粘连就显得极为重要。

肿瘤组织块移植法是先建立小鼠胰腺癌原位移植瘤,小鼠成瘤后剥离出肿瘤组织,剪成 1 mm³ 大小的组织块,然后缝合于胰尾被膜上。本研究中,采用此方法的成瘤率高,且短时间内无转移,肿瘤均质性良好,粘连较轻,但仍存在一定程度的粘连,II 级粘连可达 60%。整体而言,肿瘤组织块移植法是建立小鼠胰腺癌原位模型较好的方案。

生物水凝胶材料是近年来极具潜力的医用生物材料,被广泛应用于生物医学领域^[17-18]。本研究采用强韧的聚丙烯酰胺-海藻酸钙双网络水凝胶将肿瘤组织粘接于胰腺上,此方法不需缝合,手术时间短,腹腔暴露时间短,且壳聚糖具有一定的防粘连作用,腹腔粘连显著减轻。因此,这种建模方法具有成瘤率高、粘连少、无转移及肿瘤大小均一的优点,是建立原位胰腺癌模型较理想的方案。但是本研究中水凝胶在 16 d 内不能完全降解,导致肿瘤组织局部发生慢性炎症反应。因此,在开展肿瘤微环境的相关研究时应慎用该方法,或需严格做好对照。未来研发具有降解速度快、防粘连、可减轻炎症反应的新型生物水凝胶材料有望为高效建立原位胰腺癌模型提供有效辅助。

综上所述,肿瘤细胞悬液直接注射法、含基质胶的肿瘤细胞悬液注射法、肿瘤组织块移植法和肿瘤组织块水凝胶粘接法建立的小鼠原位胰腺癌在病理组织学上均无显著差异,肿瘤细胞具有相似的生物学行为,且符合人类胰腺癌的生物学特性。其中肿瘤组织块移植法及水凝胶粘接法所形成的移植瘤并未改变肿瘤细胞的生物学特性,且其成瘤率高,转移少,粘连程度轻,易于操作和普及,为探究胰腺癌物理消融效果提供了较理想的建模方案,也可广泛应用于胰腺癌其他治疗方案的相关研究。

[作者贡献]

毛璐婧: 提出研究思路和设计, 主导完成实验, 撰写文章;
张娜娜: 协助完成动物实验且术后观察随访, 协助文章撰写;
刘昊: 协助完成动物实验, 整理分析数据;
史爱华: 协助完成动物实验, 制备本研究中的水凝胶;
朱子语: 协助整理数据及文章撰写;
吕毅: 对论文进行关键性修改和把关。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] MIZRAHI J D, SURANA R, VALLE J W, et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet, 2020, 395(10242): 2008-2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30974-0.
- [3] GUPTA R, AMANAM I, CHUNG V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer[J]. J Surg Oncol, 2017, 116(1):25-34. DOI:10.1002/jso.24623.
- [4] REYNGOLD M, PARIKH P, CRANE C H. Ablative radiation therapy for locally advanced pancreatic cancer: techniques and results[J]. Radiat Oncol, 2019, 14(1):95. DOI:10.1186/s13014-019-1309-x.
- [5] ZHU B R, LI J, DIAO L Y, et al. High-intensity focused ultrasound ablation for advanced pancreatic cancer[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(4):831-835. DOI:10.4103/jcrt.JCRT_408_18.
- [6] 王兆洪, 陈晶晶, 黄崇杰, 等. 小鼠胰腺癌原位移植瘤模型建立及其 MicroPET 检测研究[J]. 浙江医学, 2016, 38(15):1238-1240, 1249.
- [7] YANG H, LI C H, TANG J D, et al. Strong and degradable adhesion of hydrogels[J]. ACS Appl Bio Mater, 2019, 2(5):1781-1786. DOI:10.1021/acsabm.9b00103.
- [8] MUXIKA A, ETXABIDE A, URANGA J, et al. Chitosan as a

bioactive polymer: Processing, properties and applications[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 105(Pt 2):1358-1368. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.

- [9] 胡建敏, 杨春. 人体脂肪及 α -糜蛋白酶联合腹腔灌注预防肠粘连的实验研究[J]. 普外基础与临床杂志, 1997, 4(1):40.
- [10] 王翠梅. 免疫组化 PV 二步法与 SP 三步法比较[J]. 医学信息, 2015(31):312-312.
- [11] 周敏, 李涛, 苏林娜, 等. 不同声功率聚焦超声治疗不同时期胰腺癌疗效分析[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(4):668-672. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.014.
- [12] 陈诚, 吴涯昆. 高强度聚焦超声治疗进展期胰腺癌的临床表现[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2021, 28(2):271-275.
- [13] TAN M H, CHU T M. Characterization of the tumorigenic and metastatic properties of a human pancreatic tumor cell line (AsPC-1) implanted orthotopically into nude mice[J]. Tumour Biol, 1985, 6(1):89-98.
- [14] LIU QZ. Establishing orthotopic transplanted models of human pancreatic cancer in nude mice and study on their biological properties[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 1992, 14(6):403-406.
- [15] HUYNH A S, ABRAHAMS D F, TORRES M S, et al. Development of an orthotopic human pancreatic cancer xenograft model using ultrasound guided injection of cells[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20330. DOI: 10.1371/journal.pone.0020330.
- [16] TSUJI K, YANG M, JIANG P, et al. Common bile duct injection as a novel method for establishing red fluorescent protein (RFP)-expressing human pancreatic cancer in nude mice[J]. JOP, 2006, 7(2):193-199.
- [17] 孔朋旭, 潘湘斌. 水凝胶植入在心力衰竭治疗中的研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2022, 29(4):502-507. DOI:10.7507/1007-4848.202011085.
- [18] 温旭, 申晶. 纳米银抗菌水凝胶敷料联合重组人碱性成纤维细胞生长因子在踝部开放骨折创面的应用[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(29):4638-4643. DOI:10.12307/2021.162.

(收稿日期: 2021-05-10 修回日期: 2021-10-05)

(本文编辑: 张俊彦, 郭嘉欣)

更正启事

《实验动物与比较医学》2022年第42卷第1期发表文章“董波, 刘嘉欣, 熊伟, 等. 缺血性脑卒中动物模型的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 54-61. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.049”, 因第一作者疏忽, 将第四作者唐宋琪的单位名称误写为“成都岐黄博恩生物科技有限公司”, 应更正为“海南医学院(海口 571199)”。更改后该文作者信息如下:

《缺血性脑卒中动物模型的研究进展》董波¹, 刘嘉欣¹, 熊伟², 唐宋琪³, 黄巍¹ (1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 成都岐黄博恩生物科技有限公司, 成都 611130; 3. 海南医学院, 海口 571199)。

《实验动物与比较医学》2020年第40卷第1期发表文章“徐颖愉, 黄晓辉, 江漪, 等. 不同防晒标准品对紫外线致大鼠皮肤光损伤的防护作用[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(1):33-38. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.01.006”, 因作者疏忽, 将单位名称错写为“广东质量监督检测研究院”, 应更正为“广州质量监督检测研究院”。更正后该文作者信息如下:

《不同防晒标准品对紫外线致大鼠皮肤光损伤的防护作用》徐颖愉, 黄晓辉, 江漪, 李敏, 庞增雄, 李光先, 陈秀娟, 陈梓灵, 孙侠 (广州质量监督检测研究院, 广州 511447)。

《实验动物与比较医学》编辑部

利格列汀对2型糖尿病大鼠肾组织纤维化过程中骨膜蛋白及转化生长因子- β 1的影响

弓慧杰^{1,2}, 张光明²

(1. 四川省成都市新都区人民医院内分泌肾病血液内科, 成都 610500; 2. 西南医科大学病理生理研究室, 泸州 646000)

[摘要] **目的** 通过观察利格列汀对2型糖尿病大鼠肾组织纤维化过程中骨膜蛋白(periostrin)及转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的影响, 探讨利格列汀治疗糖尿病肾病患者的抗炎、抗纤维化等保护机制。**方法** 24只SD大鼠采用腹腔注射链脲佐菌素的方式建立2型糖尿病大鼠模型, 另取12只SD大鼠注射等剂量的柠檬酸缓冲液作为对照组。糖尿病模型大鼠分为模型组及治疗组。治疗组大鼠予以利格列汀($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)持续灌胃12周, 其他2组予以等量生理盐水灌胃。12周后取材, HE染色和Masson染色法观察肾组织病理学变化, 分别采用免疫组织化学法和RT-PCR法检测各组大鼠肾组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白及mRNA的表达水平。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠的肾间质有大量被深染为蓝色的炎性细胞浸润, 治疗组则有较少的炎性细胞浸润; 模型组的肾间质纤维含量比对照组增多, 而治疗组的纤维化不明显。与对照组相比, 模型组大鼠的肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达水平及mRNA含量均明显升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组大鼠的肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达水平及mRNA含量均明显降低($P < 0.05$)。**结论** 利格列汀可通过抑制2型糖尿病大鼠肾脏组织中TGF- β 1的过表达, 下调骨膜蛋白表达, 减缓肾组织纤维化进程。

[关键词] 利格列汀; 糖尿病肾病; 肾脏纤维化; 骨膜蛋白; 转化生长因子- β 1; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0135-06

Effects of Inagliptin on the Expression of Periosteal and TGF- β 1 in Renal Fibrosis of Type 2 Diabetic Rats

GONG Huijie^{1,2}, ZHANG Guangming²

(1. Department of Endocrinology, Nephropathy and Hematology, Chengdu Xindu District People's Hospital, Chengdu 610500, China; 2. Department of Pathophysiology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Correspondence to: ZHANG Guangming, E-mail: 770930017@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the effect of linagliptin on the expression of periostin and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the process of renal tissue fibrosis in type 2 diabetic rats, and explore the anti-inflammatory and anti-fibrotic protective mechanism of linagliptin on diabetic nephropathy. **Methods** Totally twenty-four SD rats were injected with streptozotocin in intraperitoneal to replicate the type 2 diabetes rats, and another 12 SD rats were injected with the same dosage of citrate buffer as the control group. The type 2 diabetic rats were randomly divided into two groups: model group and treatment group. The rats in the treatment group were continuously given linagliptin ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 12 weeks, and the other two groups were given the same amount of normal saline. The pathological changes of renal were observed by HE staining and Masson staining. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expressions of periostin and TGF- β 1 protein and mRNA levels in kidney tissues of rats, respectively. **Results** HE staining showed that compared with the control group, there were a large number of inflammatory cells in the renal stroma in the model group, while there were less inflammatory

[作者简介] 弓慧杰(1984—),男,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病肾病微血管并发症。E-mail: 82295788@qq.com

[通信作者] 张光明(1970—),男,主任医师,研究方向:糖尿病微血管并发症。E-mail: 770930017@qq.com

cells in the treatment group. Masson staining showed that compared with the control group, there were more collagen fibers in renal interstitial in the model group, while the collagen fibers in the treatment group was not obvious. Immunohistochemistry and RT-PCR showed that compared with control group, the protein and mRNA expressions of periostin and TGF- β 1 in rat renal in model group were significantly increased ($P < 0.05$), while they were decreased in treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inaglipatin maybe reduce the protein expression of periostin by inhibiting the overexpression of TGF- β 1 in the kidney of type 2 diabetic rats, and slow down the progression of renal fibrosis.

[Key words] Inaglipatin; Diabetic nephropathy; Renal fibrosis; Periostin; Transforming growth factor- β 1; Rats

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症, 其主要表现为肾脏纤维化, 最终发展为终末期肾病, 是导致慢性肾功能衰竭的主要原因之一^[1]。肾脏纤维化的病理生理变化是肾脏固有细胞被大量细胞外基质取代, 分泌大量炎症介质及细胞因子, 从而破坏肾脏正常结构^[1]。骨膜蛋白 (periostin) 是一种细胞外基质蛋白, 研究发现在侵袭、迁移及黏附能力明显提高的细胞内其表达水平明显升高^[2]。另外在以机体组织纤维化及迁移为特点的病理生理过程中, 骨膜蛋白通过对胶原蛋白的调节, 参与肾脏纤维化^[3]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是引起肾脏损伤的重要炎症因子之一, 也是单核巨噬细胞等分泌的具有多种生物学功能的细胞因子, 在肾脏纤维化进展过程中发挥重要的促进作用。利格列汀 (Inaglipatin) 是一种二肽基肽酶4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 抑制剂, 通过高效地选择性抑制 DPP-4 来调节血糖, 具有一定的肾脏保护作用^[4]。本实验以2型糖尿病大鼠为研究对象, 观察肾组织纤维化过程中骨膜蛋白和 TGF- β 1 的表达变化, 以及利格列汀是否会影响这两个指标的表达水平, 为治疗糖尿病肾病提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性SD大鼠36只, 体质量为230~250 g, 由西南医科大学实验动物中心 [SCXK (川) 2018-17] 提供, 动物质量合格证号为川医动字第2401115, 饲养于西南医科大学实验动物中心 [SYXK (川) 2018-065] 的屏障环境。动物实验经西南大学动物福利伦理委员会审查批准 (文号: IACUC2018001592)。

1.1.2 实验仪器

微型凝胶电泳仪 (日本 Mupid 公司), 全光谱酶标

读数仪 (10~240 VAC, 美国 Thermo 公司), 紫外分光光度计 (JC-UT2000 型, 成都光学仪器厂), 凝胶图像扫描系统 (Tannon 2500 型, 美国 BioRad 公司), 光学显微镜 (AX-72 型, 日本 Olympus 光学仪器公司)。

1.1.3 主要试剂

利格列汀片 (欧唐宁[®], 批号 H20130865, 美国 Eli Lilly and Company 公司), TRIzol 试剂盒及 RT-PCR 试剂盒 (成都市博瑞克生物技术有限公司), 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (美国 Sigma 公司), ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司), SP 免疫组化检测试剂盒 (泉州市睿信生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型建立及分组

24 只大鼠禁食不禁水 12 h 后, 称其体质量并腹腔注射 60 mg/kg 的 STZ, 建立糖尿病模型。另外 12 只 SD 大鼠注射等剂量的柠檬酸缓冲液, 作为对照组。注射 STZ 的大鼠 48 h 后尾静脉取血, 测空腹血糖水平, 血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L 的大鼠确定为造模成功。24 只大鼠均造模成功。将造模成功的大鼠随机分为糖尿病模型组及治疗组, 每组各 12 只。治疗组大鼠予以利格列汀 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 持续灌胃 12 周, 模型组及对照组予以等剂量的生理盐水 (即 0.9% NaCl 溶液) 灌胃相同时间。实验期间各组大鼠均给予普通饲料喂养, 12 周后 3 组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉, 开腹取肾脏备用。

1.2.2 肾脏切片 HE 染色观察

将大鼠肾脏组织用 4% 甲醛溶液固定 2~3 h 后包埋并切片; 切片置入苏木精染液中 5 min, 自来水充分清洗后置于 1% 的盐酸乙醇溶液中分化数秒, 用自来水冲洗; 再次将切片置入伊红染液中染色 5 min, 充分清洗; 再次将切片置于梯度乙醇溶液及无水乙醇中脱水 5 min, 放入二甲苯中透明 5 min 后, 用树胶封固。光学显微镜 (100 倍、200 倍) 下观察, 拍照。

1.2.3 RT-PCR检测肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1 mRNA 转录水平

依据 TRIzol 试剂盒说明书提取各组大鼠肾脏组织中 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 然后采用紫外分光光度法测定 RNA 的纯度和浓度。采用反转录试剂盒将总 RNA 进行反转录, 分别得到模板单链 cDNA 后进行 PCR 反应。骨膜蛋白上游引物序列为 5'-GCTGGCACCTGTGAATA-3', 下游引物序列为 5'-TCTCCCTTGCTTACTCC-3', 目标产物长度为 252 bp; TGF- β 1 基因上游引物序列为 5'-TGGAAACGACCTTCTATGACGATG-3', 下游引物序列为 5'-TGATGTGCCCCGTGCTGGAC-3', 目标产物长度为 195 bp。GAPDH 上游引物序列为 5'-CAACTCCCTCAAGATTGT CAGCAA-3', 下游引物序列为 5'-GGCATGGACTGTG GTCATGA-3', 目标产物长度为 207 bp。PCR 反应体系: dNTP 原料混合液 10 μ L, 转录酶 0.5 μ L, RT-PCR 增强剂 0.25 μ L, 模板 cDNA 5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 无核酸酶水 2.25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性, 50 $^{\circ}$ C 10 s 退火, 70 $^{\circ}$ C 30 s 延伸, 35 个循环。反应后的产物经琼脂糖凝胶电泳, 分离目的条带, 拍照。最终结果以目的基因与内参 GAPDH 光密度的比值表示骨膜蛋白、TGF- β 1 的 mRNA 转录情况。

1.2.4 免疫组织化学法检测肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 蛋白表达

将大鼠肾脏组织制作切片标本, 然后用磷酸缓冲

盐溶液清洗, 冷丙酮 4 $^{\circ}$ C 固定 15 min 后, 再次磷酸缓冲盐溶液漂洗; 3% 去离子水室温孵育 15 min 后血清封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加入兔抗鼠骨膜蛋白一抗或马抗鼠 TGF- β 1 一抗 (工作液体积稀释比例分别为 1:200、1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 磷酸缓冲盐溶液漂洗, 加入山羊抗兔二抗或兔抗马二抗 (工作液体积稀释比例分别为 1:50、1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 磷酸缓冲盐溶液漂洗, 加 DAB 显色剂显色。光学显微镜 (400 倍) 下选取 30 个随机视野, 摄影, 然后使用 IPP 软件分析平均积分光密度 (integral optical density, IOD), 以此反映骨膜蛋白和 TGF- β 1 蛋白的含量。

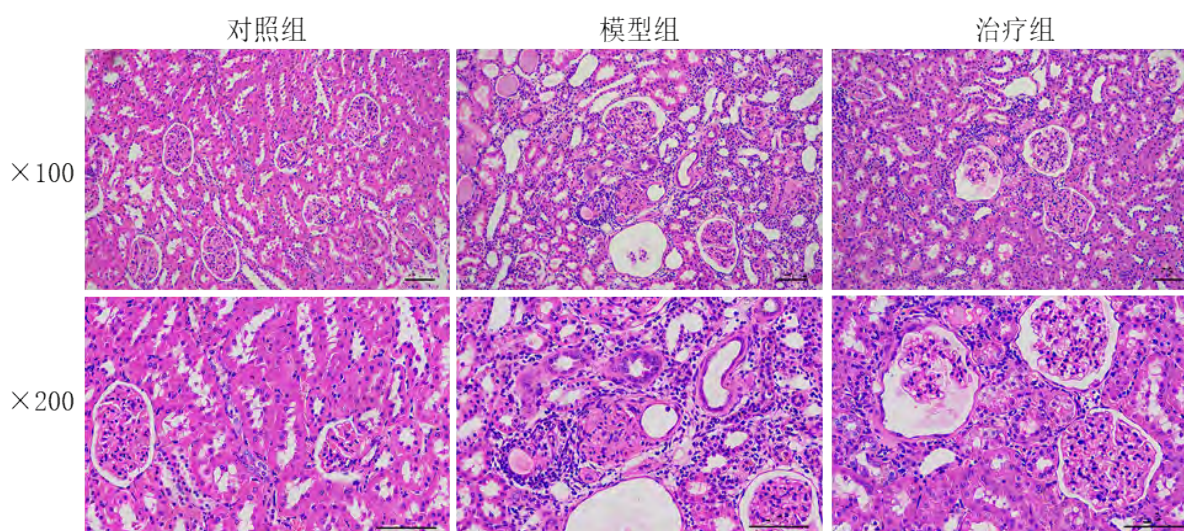
1.3 统计方法

采用统计软件 SPSS 22.0 进行结果分析。各实验的检测数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利格列汀抑制糖尿病模型大鼠的肾组织纤维化

HE 染色后光学显微镜下观察结果 (图 1) 显示, 对照组大鼠的肾小球分布相对密集, 大部分呈椭圆形, 外周光滑; 血管球内毛细血管分布也密集; 肾小管的管腔光滑、规整。与对照组比较, 糖尿病模型组大鼠的肾皮质内小叶间动脉、入球小动脉、弓形动脉的管



注: 上下两行图片中比例尺大小分别为 10 μ m 和 20 μ m。

图1 HE 染色显示各组大鼠肾脏组织病理学特征 (×100, ×200)

Figure 1 The pathological characteristics in renal interstitium of rats detected by HE staining (×100, ×200)

壁明显增厚,管腔明显变小;细胞外基质增多;有大量染色较深且核质比例相对较大的炎性细胞浸润,肾小管明显扩展;肾小球出现萎缩,纤维化明显。治疗组较模型组的纤维化病变明显减轻。

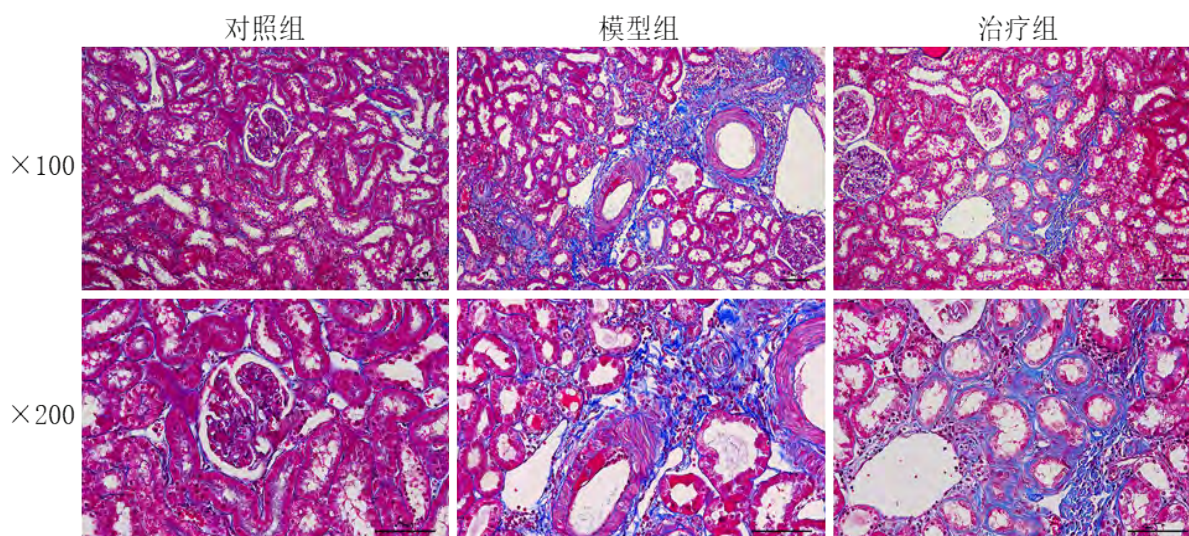
2.2 利格列汀抑制糖尿病模型大鼠的肾小管间质病变

Masson 染色结果显示,肾脏胶原着色主要位于 Bowman 囊、肾小球基底膜和肾小管微血管周围。与对照组相比,糖尿病模型组大鼠的肾间质宽度增加,系膜基质增生,肾小管管腔扩张,肾间质深蓝色胶原

沉积显著。治疗组大鼠的肾小管间质病变明显轻于模型组(图2)。

2.3 利格列汀下调糖尿病模型大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 转录

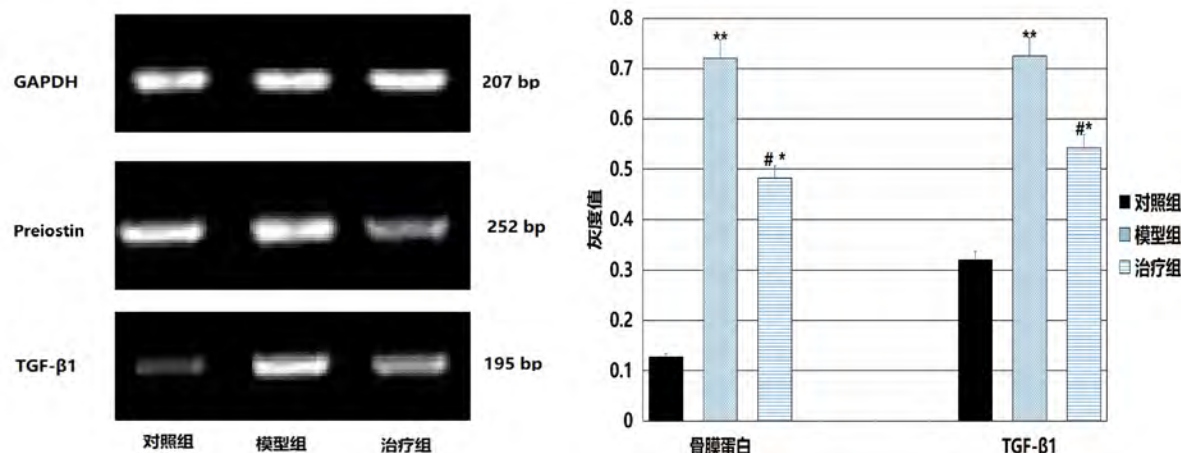
RT-PCR 检测结果显示,与对照组相比,糖尿病模型组大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P=0.0315$);与糖尿病模型组比较,治疗组糖尿病大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 表达水平明显下降,差异有显著的统计学意义($P=0.0072$)(图3)。



注:上下两行图片中比例尺大小分别为10 μ m和20 μ m。

图2 Masson 染色显示各组大鼠肾组织($\times 100$, $\times 200$)

Figure 2 The pathological characteristics in renal interstitium of rats detected by Masson staining ($\times 100$, $\times 200$)



注: TGF- β 1 即转化生长因子- β 1。每组大鼠12只,与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

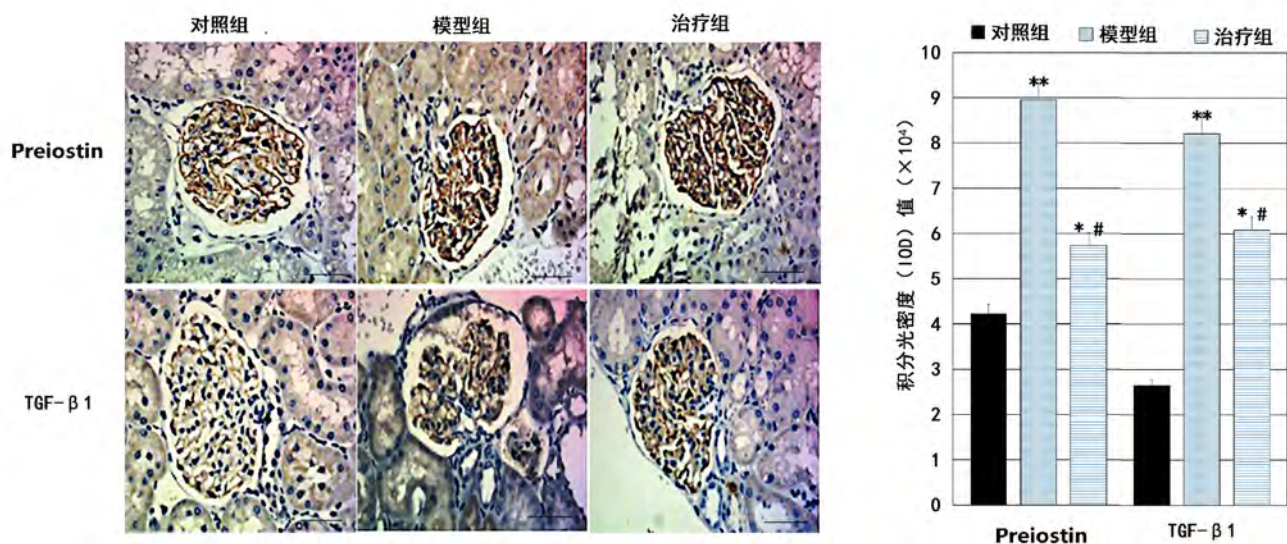
图3 RT-PCR 法检测各组大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 表达

Figure 3 The expressions of periostin and TGF- β 1 mRNA of in renal renal interstitium of rats detected by RT-PCR

2.4 利格列汀下调糖尿病模型大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达

免疫组织化学法检测结果(图4)显示,与对照组相比,糖尿病模型组大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和TGF-

β 1表达水平偏高,差异有统计学意义($P=0.0038$);与糖尿病模型组相比,治疗组糖尿病大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1表达水平明显下调,差异有统计学意义($P=0.0370$)。



注: TGF- β 1即转化生长因子- β 1。每组大鼠12只,与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。比例尺=5 μ m。

图4 免疫组织化学法检测各组大鼠肾组织骨膜蛋白和TGF- β 1的表达变化(DAB染色,×400)

Figure 4 The expressions of periostin and TGF- β 1 protein in renal renal interstitium of rats detected by immunohistochemistry (DAB, ×400)

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病晚期出现的一种严重的微血管并发症,是临床上糖尿病患者主要的死亡原因之一,患者死亡率远大于其他慢性肾脏病患者。肾脏纤维化是糖尿病肾病进展的主要特征,其表现为肾脏本身实质细胞合成细胞外基质增多。研究发现,肾脏纤维化进展与肾素-血管紧张素-醛固酮系统、炎症反应及氧化应激密切相关,其中TGF- β 1对信号转导发挥着重要作用^[5]。因此,TGF- β 1及其下游的调节因子作为抗纤维化治疗的有效靶标,受到越来越多的关注^[6]。TGF- β 1是一种具有多项调节功能的纤维形成生长因子,可诱导肾脏血管内皮细胞向肌成纤维细胞转分化,在肾脏纤维化过程中起到关键决定性作用^[7]。推测TGF- β 1是糖尿病肾病纤维化过程中的核心因子,可通过促进肾脏实质细胞外基质蛋白的分泌合成并抑制降解,诱导肾脏实质细胞发生炎症反应,加速糖尿病肾病的发展。因此,研究糖尿病肾病纤维化进展机制并开发有效的阻断药物,成为了目前迫切需要探讨的研

究内容之一。

骨膜蛋白作为一种细胞外基质蛋白,可以通过整合蛋白受体产生粘附作用,并与多种胶原蛋白结合,促进I型胶原蛋白、V型胶原蛋白、肝素黏连蛋白等的分泌及成熟,参与糖尿病肾病纤维化^[8]。骨膜蛋白是早期肾病肾小管损伤的敏感性生物标志物,并且与糖尿病肾病的并发症关系密切^[9]。有文献报告,受到损伤的急性肾小管上皮细胞中骨膜蛋白处于高表达状态,I型、III胶原蛋白表达增加,推测骨膜蛋白可能通过某种途径参与了III胶原蛋白形成^[11];然而这一结论还需要通过后续的体内外实验进行验证,例如将骨膜蛋白基因沉默质粒转染至糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞,探讨骨膜蛋白调控III胶原蛋白的病理生理机制。另外,推测TGF- β 1作为糖尿病肾病纤维化过程中的核心因子,可能通过正相关调控骨膜蛋白的表达水平,加速糖尿病肾病进展。本实验结果证实,在糖尿病模型组中TGF- β 1和骨膜蛋白及其mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$),提示两个指标之间有一定的相关性。

利格列汀是一种治疗2型糖尿病的药物,其作用模式是抑制胰高血糖素样肽1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 代谢。GLP-1 是一种肠促胰岛素,具有葡萄糖浓度依赖性。利格列汀还可以抑制胰高血糖素的释放^[11]。另外,利格列汀是一种DPP-4抑制剂,可能是治疗2型糖尿病肾病的一种潜在的新型药物^[12]。有文献报告,在糖尿病小鼠动物实验中,DPP-4治疗后TGF- β 1水平较对照组明显下降,说明在2型糖尿病大鼠实验中利格列汀不仅可以改善早期糖尿病肾病的血糖水平,而且还有保护肾脏功能及调节机体炎性状态的作用,在早期糖尿病肾病的病情控制中发挥着重要作用^[13]。本实验结果表明,糖尿病肾病大鼠经利格列汀干预后骨膜蛋白及TGF- β 1表达均明显下调,对肾脏纤维化有一定保护作用,这与文献[13]的研究结果一致。

综上所述,本实验中糖尿病模型组大鼠骨膜蛋白及TGF- β 1均处于高表达状态,而经利格列汀治疗后,骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达及mRNA转录水平均明显下降。结合本实验结果推断,腹腔注射利格列汀可下调糖尿病小鼠肾脏中TGF- β 1水平,从而促进骨膜蛋白降解,延缓糖尿病肾脏纤维化的发生与发展。本研究结果提示,TGF- β 1可能是一个重要的调控因子,可能成为治疗糖尿病肾病进展的作用靶点,为糖尿病肾病纤维化的预防和治疗提供了新的思路。

[作者贡献]

弓慧杰:实验的实施,数据整理,论文书写。

张光明:实验指导,论文修改。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] GENG J N, YU X Y, LIU C Y, et al. Herba artemisiae capillaris extract prevents the development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy of rat[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:5180165. DOI:10.1155/2018/5180165.
- [2] RIENER M O, FRITZSCHE F R, SOLL C, et al. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas[J]. Histopathology, 2010, 56(5):600-606. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03527.x.
- [3] STANSFIELD W E, ANDERSEN N M, TANG R H, et al. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart[J]. Ann Thorac Surg, 2009, 88(6):1916-1921. DOI:10.1016/j.athoracsurg.2009.07.038.
- [4] KANG Y M, JUNG C H. Effects of incretin-based therapies on diabetic microvascular complications[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2017, 32(3):316-325. DOI:10.3803/EnM.2017.32.3.316.
- [5] CHEN L, YANG T, LU D W, et al. Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 670-681. DOI:10.1016/j.biopha.2018.02.090.
- [6] CHEN D Q, CAO G, CHEN H, et al. Gene and protein expressions and metabolomics exhibit activated redox signaling and Wnt/ β -catenin pathway are associated with metabolite dysfunction in patients with chronic kidney disease[J]. Redox Biol, 2017, 12: 505-521. DOI: 10.1016/j.redox.2017.03.017.
- [7] CHUNG J H, HWANG H J, KIM S H, et al. Associations between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease: the 2010 to 2012 Korean national health and nutrition examination survey[J]. J Periodontol, 2016, 87(8):864-871. DOI:10.1902/jop.2016.150682.
- [8] IEKUSHI K, TANIYAMA Y, AZUMA J, et al. Novel mechanisms of valsartan on the treatment of acute myocardial infarction through inhibition of the antiadhesion molecule periostin[J]. Hypertension, 2007, 49(6):1409-1414. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.080994.
- [9] 赵雪, 郝军, 戎赞华, 等. 敲低periostin对PDGF引起的系膜细胞增殖和细胞外基质表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11): 1608-1612. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2019.11.023.
- [10] AN J N, YANG S H, KIM Y C, et al. Periostin induces kidney fibrosis after acute kidney injury via the p38 MAPK pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(3): F426-F437. DOI: 10.1152/ajprenal.00203.2018.
- [11] HASAN A A, HOCHER B. Role of soluble and membrane-bound dipeptidyl peptidase-4 in diabetic nephropathy[J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(1): R1-R10. DOI:10.1530/JME-17-0005.
- [12] CIVANTOS E, BOSCH E, RAMIREZ E, et al. Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2017, 10: 207-222. DOI:10.2147/DMSO.S132537.
- [13] GANGADHARAN KOMALA M, GROSS S, ZAKY A, et al. Linagliptin limits high glucose induced conversion of latent to active TGF β through interaction with CIM6PR and limits renal tubulointerstitial fibronectin[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141143. DOI: 10.1371/journal.pone.0141143.

(收稿日期:2021-05-10 修回日期:2021-10-25)

(本文编辑:张俊彦,周烁)

花生四烯酸诱导建立大鼠弥漫性脑血栓模型

宁 珑, 孙 航, 冯 晋, 孟庆婷, 杨 茜, 何芳雁

(云南中医药大学中药学院, 昆明 650000)

[摘要] **目的** 建立并优化花生四烯酸诱导的大鼠弥漫性脑血栓模型。**方法** 经颈内动脉注射花生四烯酸, 建立大鼠弥漫性脑血栓模型; 同时设定假手术组作为对照。通过检测脑组织中伊文思蓝 (Evans blue, EB) 渗出含量以及 HE 染色法检测脑组织病理损伤程度评价建模效果。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠损伤侧脑组织中均出现弥漫性 EB 渗出 ($P < 0.01$), 且渗出情况均一性较好。损伤侧脑组织病理表现为细胞排列混乱, 细胞核皱缩, 细胞间隙增大, 空泡细胞增多, 个别微血管呈红色条形管型的缺血病理损伤。**结论** 花生四烯酸可成功诱导弥漫性脑血栓模型, 且优化方法后模型稳定性较好, 死亡率较低。

[关键词] 弥漫性脑血栓; 花生四烯酸; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0141-05

Model of Diffuse Cerebral Thrombosis Induced by Arachidonic Acid in Rats

NING Long, SUN Hang, FENG Jin, MENG Qingting, YANG Qian, HE Fangyan

(School of Chinese Material Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China)

Correspondence to: HE Fangyan, E-mail: 735137511@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** Establishment and optimization of arachidonic acid-induced diffuse cerebral thrombosis model in rats. **Methods** Arachidonic acid was injected into the internal carotid artery to establish a diffuse cerebral thrombosis model in rats, while the sham operation group was set as the control. The model was evaluated by detecting the exudate content of Evans blue (EB) in brain tissue and the pathological damage degree of brain tissue by HE staining. **Results** Compared with the sham operation group, diffuse EB exudation was observed in the injured brain tissue of the model group ($P < 0.01$), and the exudation was relatively uniform. The HE staining of brain tissue on the side of the injury showed ischemic pathological damage with disorganized cell arrangement, wrinkled nuclei, enlarged cell gaps, increased vacuolated cells, and red striped tubular shape of each individual microvessel. **Conclusion** Arachidonic acid can successfully induce diffuse cerebral thrombosis model, and the optimized model has better stability and lower mortality.

[Key words] Diffuse cerebral thrombosis; Arachidonic Acid; Rats

缺血性脑卒中 (ischemic stroke) 是我国脑血管疾病中发病率最高的病种。虽然在时间窗内 (<4.5 h) 使用组织纤维溶酶原激活物 (tissue-plasminogen activator, t-PA) 溶栓可改善大部分缺血性脑卒中患者的预后^[1], 但会增加患者出血转化 (hemorrhagic transformation) 的风险; 如超时间窗使用, 其风险将增加 10 倍, 死亡率提高 10%~40%^[2]。由于缺血性脑卒

中临床病情复杂, 临床前研究需根据病因、缺血时间及损伤程度等选择适合的缺血性脑卒中模型, 同时还须考虑模型的稳定性、可靠性、易行性、经济性等特征。临床弥漫性脑血栓是造成缺血性脑卒中的主要原因之一。

1988 年 Cahn 等^[3] 利用花生四烯酸 (arachidonic acid) 诱导血小板活化与聚集、血管内皮损伤, 其在体

[基金项目] 云南省中医药学科后备人才培养项目; 云南省科技厅科技计划项目 (202101AZ070001-009; 202101AT070264)

[作者简介] 宁 珑 (1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 986244037@qq.com

[通信作者] 何芳雁 (1989—), 女, 实验师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 735137511@qq.com

内可代谢为血栓素A₂、白三烯等多种产物,使血栓素A₂与前列腺素I₂的比例失衡,促使血小板聚集、血管收缩,形成脑血栓;并且在花生四烯酸引起的脑血栓损伤后几分钟内即可发生血管源性脑水肿和血脑屏障损伤^[4]。因此,通过该方法可以建立操作简单、手术时间短、对实验动物创伤程度低的大鼠弥漫性脑血栓模型。然而由于当时的操作细节不够完善,例如手术切口不合理、未规定花生四烯酸的保存方式、麻醉药物选用不合适等原因,该模型复制的稳定性差、死亡率高,限制了推广应用。

本实验总结了通过颈内动脉注射花生四烯酸建立大鼠弥漫性脑血栓模型的操作要点,完善操作细节,并以脑组织伊文思蓝(Evans blue, EB)渗出含量及缺血病理损伤程度为依据,对模型的成功率及稳定性进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~8周龄的SPF级雄性SD大鼠24只,体质量为250~300 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2019-0004],质量合格证号为430727210100499718。动物饲养于云南中医药大学动物实验室[SYXK(滇)K2017-0005],饲养室温度为20~25℃,相对湿度为50%~65%,日光灯照明12 h,自由进食与饮水。动物实验方案经本单位实验动物伦理委员会审批通过(编号R-062019LH001)。

1.2 药物与试剂

花生四烯酸(批号XKN3C-JG)购自东京化成工业株式会社;阿托品(批号130404)购自上海禾丰制药有限公司;多聚甲醛(批号20100525)购自天津化学试剂研究所;异氟烷(批号217180101)购自深圳市瑞沃德生命科技与有限公司;肝素钠注射液(批号151607006A)购自常州千红生化制药股份有限公司;EB(批号L04D11J133367)购自上海源叶生物科技有限公司;苏木精(批号1612154094)、伊红(批号1612154094)均购自福州迈新生物技术开发有限公司;盐酸(批号20081215)购自成都市科龙化工试剂厂;中性树胶(批号20150202)购自上海标本模型厂。

1.3 主要仪器

石蜡包埋机(型号HISTOSTATS)和石蜡切片机(型号Microm HM)为赛默飞世尔科技(中国)有限公

司产品;显微镜(型号Nikon DS-U3)为日本NIKON公司产品;数字式超级恒温浴槽(型号HSS-1B)为成都仪器厂产品;烘箱(型号DHG-9140A)为上海慧泰仪器制造有限公司产品;电子分析天平(型号AB204-S)为瑞士Mettler Toledo公司产品;小动物麻醉机(型号V1824301)为美国Marex公司产品。

1.4 花生四烯酸的配制及保持方法

向规格为50 mg/支的花生四烯酸中加入10 mL浓度为100 mmol/L的Na₂CO₃,分装后冲氮气密封保存于-80℃冰箱备用;使用前用生理盐水(即0.9% NaCl溶液)将花生四烯酸稀释到质量浓度为0.5 g/L,现用现配。

1.5 大鼠弥漫性脑血栓模型复制

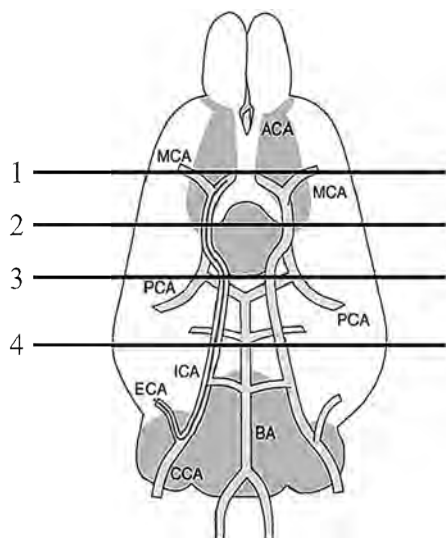
将大鼠随机分为假手术组和模型组,每组12只(一半用于EB染色,一半用于HE染色)。用异氟烷吸入麻醉,并肌内注射治疗剂量的阿托品。使右侧颈部皮下筋膜暴露,钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉,并结扎颈外动脉分支和颈总动脉近心端,在其远心端用动脉夹夹紧,显微剪在颈总动脉游离端剪一个小口,插入导管,去除动脉夹。将0.5 mg/kg花生四烯酸(0.1 mL/100 g体质量)经导管(使用前先经肝素-生理盐水抗凝处理)注入颈总动脉,后结扎远心端动脉,进行缝合。实验过程中使大鼠仰卧于加热垫上,保持肛温恒定在37℃^[3,5]。假手术组钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉后即可进行缝合,不注入任何药物。

1.6 脑组织中EB含量测定

注入花生四烯酸后5 min立即注入0.2% (0.5 mL/100 g体质量) EB,再过5 min后立即用手术剪断头处死动物,开颅取出大脑,脑组织沿脑桥上界面切断,去除嗅球。按图1所示,在脑前极与视交叉连线中点、视交叉处、漏斗柄处以及漏斗柄与后叶尾极之间冠状方向将脑分为5块组织。拍照后将脑组织放入匀浆器中,加入5 mL 0.5% Na₂SO₄及丙酮(3:7)混合液制成匀浆液,试管密封静置60 min以上;经3 000 r/min离心10 min,取上清液在620 nm波长处测定吸光度值。以栓塞侧的吸光度值与脑质量之比表示EB的含量,反映脑血栓的严重程度。

1.7 HE染色观察脑组织病理改变

按1.6节方法取脑、切块后,4%多聚甲醛溶液固定过夜。次日将第2、3、4片脑组织放入镂空铝盒中,以流动的水浸泡2 h以上,依次经过梯度乙醇溶液脱水、二甲苯透明、浸泡石蜡,然后进行组织包埋及切



注：MCA为大脑中动脉，ACA为大脑前动脉，PCA为大脑后动脉，ICA为颈内动脉，ECA为颈外动脉，CCA为颈总动脉，BA为基底动脉；1、2、3、4表示脑组织分割线。

图1 大鼠弥漫性脑血栓模型的脑组织冠状切块示意图

Figure 1 Coronal slices of brain tissue in rats with diffuse cerebral thrombosis

片。石蜡切片在59~62℃烤箱内烘烤20 min后，进行常规脱蜡复水，依次为二甲苯1、二甲苯2、无水乙醇

1、无水乙醇2、95%乙醇溶液、90%乙醇溶液、80%乙醇溶液、70%乙醇溶液、自来水浸泡5 min。复水后的脑组织经苏木精染色5 min，用流动水冲洗10 min后，1%盐酸乙醇溶液分化。再用流动的水冲洗10 min，使用伊红染色25~35 s，梯度乙醇溶液脱水后中性树胶封固。最后用光学显微镜观察，并拍照。

1.8 统计分析

采用SPSS 26软件进行数据统计分析。结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用独立样本均数 t 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织渗出EB含量增多

建模过程中两组大鼠均未见死亡。与假手术组大鼠的脑组织中EB含量($0.16 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$)比较，经花生四烯酸经颈内动脉注射建立的弥漫性脑血栓模型组大鼠缺血侧的EB含量($0.25 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$)明显升高，差异有统计学意义($n=6$, $P < 0.01$)。两组大鼠脑组织经EB染色后的拍照结果见图2。



注：每组6只大鼠，每只大鼠的脑组织分别在脑前极与视交叉连线中点、视交叉处、漏斗柄处以及漏斗柄与后叶尾极之间冠状方向分割成5块（自上而下）进行EB染色。

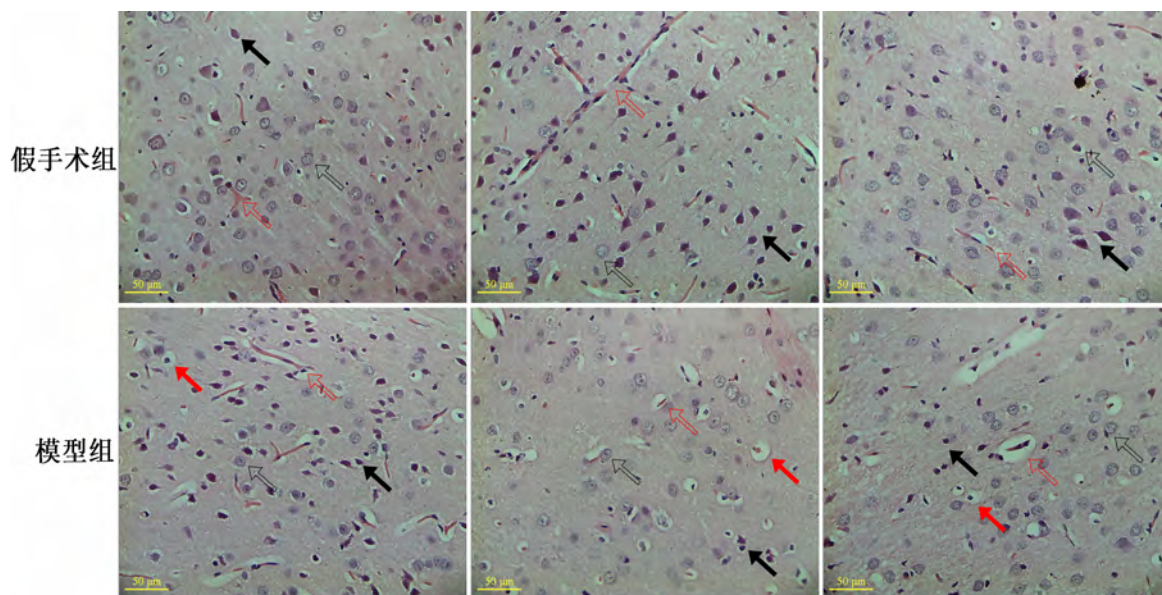
图2 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织的依文思蓝染色结果

Figure 2 Evans blue (EB) staining images of brain tissue in rats with diffuse cerebral thrombosis

2.2 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织病理学变化

HE染色结果显示，假手术组大鼠的脑组织细胞排列整齐，细胞间隙均匀，细胞形态完整，神经元形态完整，微血管腔无阻塞；与假手术组相比，模型组大

鼠的脑组织细胞排列混乱，细胞间隙增大，细胞核皱缩，空泡细胞增多，神经细胞出现凋亡，个别微血管呈红色条形的管型。图3是各组随机选3只大鼠的HE染色结果。



注：各组分别显示3只大鼠的HE染色结果。图中红色虚线箭头指示血管，红色实线箭头指示空泡细胞，黑色虚线箭头指示细胞形态，黑色实线箭头指示神经元形态。比例尺大小均为50 μm 。

图3 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织的HE染色结果($\times 40$)

Figure 3 HE staining of brain tissue in diffuse cerebral thrombosis model rats ($\times 40$)

3 讨论

EB为偶氮基荧光染料，进入血液后与血浆白蛋白高度结合，正常情况下该结合物无法透过血脑屏障；当血脑屏障被破坏时，通透性升高，该结合物方可透过血脑屏障进入脑组织。脑损伤程度与血脑屏障通透性呈正相关，损伤越严重，血脑屏障的通透性越高，即EB透过的量越多，染蓝程度越深。因此检测脑组织中EB渗出的含量可判断脑损伤的程度^[6-7]。HE染色为经典的组织病理检查方法^[8]，操作简单，结果可靠，其中伊红染料可使不同形态的细胞因其成分不同呈现出深浅不一的粉红色^[9-10]。缺血性脑卒中发生后，脑组织细胞质浓缩红染；神经细胞出现凋亡，排列紊乱，数量减少；细胞核皱缩、碎裂；微血管呈红色条管型；细胞肿胀，可见胶质水肿，并出现凋亡，形成大量空泡细胞^[11-12]。

相较于经典方法^[3]，本研究有以下创新之处：(1) 规定进行右侧切口，较正中切口更便于颈总动脉、颈外动脉的分离，减少动物出血和对气管的刺激，避免气管痉挛和过多分泌物的产生，减少动物死亡率^[5]。而且左侧迷走神经直接分布于心脏，进行手术将影响心脏功能，于右侧操作可减少不必要的脑外因素。(2) 改进动物麻醉方式，采用异氟烷吸入麻醉代

替戊巴比妥钠麻醉，避免动脉收缩压和平均动脉压升高而造成动物心率降低，并在术中、术后对动物进行保温，减轻呼吸及心脏功能抑制，降低死亡率。(3) 改进花生四烯酸的保存方式，将花生四烯酸充氮气密封存于 -80°C 冰箱，造模液（花生四烯酸-生理盐水）现用现配，提高花生四烯酸的稳定性。(4) 规范造模方式，用7~8周龄（体质量为250~300 g）的雄性SD大鼠实施手术。(5) 用肝素-生理盐水对手术引导管进行抗凝处理，防止血凝块阻塞引导管。

本实验结果显示，较假手术组，模型大鼠缺血侧出现弥漫性EB渗出量明显增加（ $P < 0.01$ ）；且缺血侧脑组织细胞排列紊乱，部分皱缩，染色加深，空泡细胞增多，神经细胞出现凋亡。结果提示缺血侧血脑屏障被破坏，大鼠弥漫性脑血栓模型复制成功，且模型大鼠死亡率低、稳定性好。

目前临床脑血栓的发生受多因素、多途径诱导，血管内皮细胞损伤与收缩、血小板活化与聚集、纤维蛋白凝固、血管壁炎症反应、斑块的不稳定性增加、斑块破裂、局部栓子形成等都与脑血栓的形成密切相关^[13]。因此，用花生四烯酸诱导建立脑血栓模型适用于由血小板活化与聚集、血管内皮损伤导致的血栓栓塞性相关疾病的研究。

[作者贡献]

宁琰: 负责主要实验工作, 文章资料收集、整理及撰写;
孙航: 负责主要实验工作, 协助资料收集和论文撰写;
冯晋: 对全文数据进行分析, 参与实验及文章修改;
孟庆婷: 对文章图片进行处理, 参与实验及文章修改;
杨茜: 对全文数据及图片进行校对, 参与实验;
何芳雁: 负责实验设计及指导, 并对文章进行修改把关。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] KANAZAWA M, TAKAHASHI T, NISHIZAWA M, et al. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke[J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(3): 240-253. DOI: 10.5551/jat.RV16006.
- [2] LEES K R, BLUHMKE E, VON KUMMER R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials[J]. Lancet, 2010, 375(9727):1695-1703. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60491-6.
- [3] CAHN J, BORZEIX M G. The sodium arachidonate-induced cerebral infarct in the rat: a model for the study of drugs[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1982, 2(Suppl 1): S74-S77. DOI: 10.1016/0018-506X(82)90054-X.
- [4] 李泓. 花生四烯酸代谢、血小板激活因子、血小板膜蛋白与脑缺血[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册, 1996, 23(2): 80-83. DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1996.02.009.
- [5] 何芳雁, 韩春妮, 李艳, 等. 制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要点和体会[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4):46-48. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.04.012.
- [6] LEE B R, JOO K I, CHOI E S, et al. Evans blue dye-enhanced imaging of the brain microvessels using spectral focusing coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. PLoS

- One, 2017, 12(10): e0185519. DOI: 10.1371/journal.pone.0185519.
- [7] CANGALAYA C, BUSTOS J A, CALCINA J, et al. Perilesional inflammation in neurocysticercosis - relationship between contrast-enhanced magnetic resonance imaging, Evans blue staining and histopathology in the pig model[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(7): e0004869. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004869.
- [8] 常颖慧, 樊小农, 石学敏. HE染色光镜观察法在脑组织形态学研究中的应用[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(5): 777-779. DOI: 10.13192/j.ljtc.2010.05.14.changyh.078.
- [9] XIAO A J, HE L, OUYANG X, et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of 15- and 35-minute suspended moxibustion after focal cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2018, 13(2):257-264. DOI: 10.4103/1673-5374.226396.
- [10] FANG X, LI Y, QIAO J, et al. Neuroprotective effect of total flavonoids from *Ilex pubescens* against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (5):7439-7449. DOI:10.3892/mmr.2017.7540.
- [11] LI X J, LIANG L, SHI H X, et al. Neuroprotective effects of curdione against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13: 1733-1740. DOI: 10.2147/NDT.S139362.
- [12] WAN J Y, WAN H F, YANG R B, et al. Protective effect of Danhong Injection combined with Naointong Capsule on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 211: 348-357. DOI: 10.1016/j.jep. 2017. 10.002.
- [13] 刘抒雯, 刘敬霞, 任非非, 等. 脑血栓的形成机制与中医药治疗脑血栓的优势[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10):2026-2029. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2015.10.079.

(收稿日期: 2021-05-08 修回日期: 2021-09-31)

(本文编辑: 富群华, 张俊彦, 任益凡)

《实验动物与比较医学》2022年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管, 上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办, 是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊), 并被美国“Chemical Abstracts”、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录, 2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高, 刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究, 以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理, 以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊, 大16开, 铜版纸, 彩色印刷; 全年出版6期, 每期定价30元/本, 全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅, 邮发代号为4-789; 也可以联系本刊编辑部购买, 联系电话: 021-50793657。E-mail: bjb50793657@163.com。编辑部地址: 上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部

胰腺星状细胞与胰腺疾病模型研究进展

魏 迅¹, 江 霞², 郑羽旋¹, 张乐文¹, 周正宇¹

(1. 苏州大学实验动物中心, 苏州 215123; 2. 深圳华大生命科学研究院, 深圳 518083)

[摘要] 常见的胰腺疾病类型有胰腺炎、糖尿病和胰腺癌。临床研究显示, 在人体内胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 可以从纤维化、氧化应激和炎症反应等方面影响胰腺病变, 导致胰腺疾病的发生。本文综述了不同胰腺疾病的造模方法, 以及 PSCs 对胰腺疾病发生发展的影响及其应用前景, 以期为研究和治疗胰腺疾病提供新思路。

[关键词] 动物模型; 胰腺星状细胞; 胰腺疾病

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0146-06

Progress of Pancreatic Stellate Cells in Research of Pancreatic Disease Model

WEI Xun¹, JIANG Xia², ZHENG Yuxuan¹, ZHANG Lewen¹, ZHOU Zhengyu¹

(1. Laboratory Animal Center of Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Shenzhen Huada Gene Research Institute, Shenzhen 518083, China)

Correspondence to: ZHOU Zhengyu, E-mail: zacharyzhou@suda.edu.cn

[ABSTRACT] Common types of pancreatic diseases are pancreatitis, diabetes and pancreatic cancer. Clinical studies have found that pancreatic stellate cells (PSCs) in patients with pancreatic diseases, contributes to fibrosis, oxidative stress and inflammation, and lead to pancreatic diseases. This article reviewed the modeling methods of different pancreatic diseases, and the influence and application prospects of PSCs in pancreatic diseases, providing a new idea for the research and treatment of pancreatic diseases.

[Key words] Animal model; Pancreatic stellate cells; Pancreatic disease

胰腺作为人体器官之一, 位于左上腹的胃和肠道之间, 结构上分为外分泌腺和内分泌腺。胰腺具有两大功能, 分别是消化和代谢。外分泌腺主要产生胰液, 其中含有大量酶; 内分泌腺主要是4种胰岛细胞, 负责分泌胰岛素和胰高血糖素, 以维持机体的血糖平衡。常见的胰腺疾病类型有胰腺炎、糖尿病和胰腺癌等。通过构建有效的动物模型研究各种胰腺疾病, 逐渐成为临床机制研究和药物开发的热点^[1]。

胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 是胰腺组织的基质细胞, 主要位于胰腺小叶间和腺泡周围区, 围绕邻近腺细胞基底部, 约占胰腺细胞总数的4%~7%^[2]。PSCs在胰腺中有两种形态: 静息状态和

活化状态。活化状态下的PSCs具有很强的增殖和迁移能力, 可促使胰腺纤维化, 从而引发胰腺疾病^[3]。目前, 关于PSCs在胰腺疾病动物模型方面的研究报告较多, 而在胰腺疾病临床发生机制及治疗应用方面的研究相对较少。本文对胰腺疾病动物模型研究中PSCs发挥的作用做一综述, 探讨PSCs影响胰腺疾病的可能机制, 为今后预防和治疗胰腺疾病的临床研究提供新的思路。

1 PSCs

1998年, 德国科学家Bachem等首次在人 and 大鼠的胰腺基质中分离出能特异性表达I型和III型胶原、

[作者简介] 魏 迅(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 糖尿病分子机制。E-mail: 767759846@qq.com

[通信作者] 周正宇(1973—), 男, 副教授, 主要从事糖尿病分子机制、动物模型与比较医学研究。E-mail: zacharyzhou@suda.edu.cn

纤连蛋白等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分的胰腺基质细胞, 由于它和肝脏中的肝脏星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 性质十分相似, 二者的细胞质内都富含能自发蓝绿荧光的维生素 A 脂滴, 故将其命名为 PSCs^[4]。PSCs 在静息状态下, 富含细胞质维生素 A 脂滴, 可特异性表达神经胶质酸性蛋白, 具有较低水平的 ECM 迁移能力^[5]。长期饮酒和吸烟、胰腺组织压力以及高血糖都会刺激静息状态的 PSCs, 使其产生一些有毒的代谢物和细胞因子, 导致氧化应激, 进而转变为活化状态^[6]。活化状态的 PSCs 特征表现为: 细胞质脂滴维生素 A 消失, ECM 迁移能力提高, 特异性表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA), 并分泌 I 型和 III 型胶原、纤连蛋白和其他 ECM 成分^[7]。

为在胰腺疾病动物模型中探究 PSCs 作用的可能机制, 需要提取原代 PSCs。目前较为成熟的提取原代 PSCs 的方法有两种: 一是用 IV 型胶原酶和链霉菌蛋白酶 E 从胆总管逆行灌注消化, 再利用碘海醇的溶解度梯度离心法分离^[8]; 二是利用组织块培养法, 体外无菌分离胰腺, 剪碎成小块, 让小块的胰腺组织贴壁后加入含 15%~20% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置于细胞培养箱内培养, 即可得到原代的 PSCs^[9]。

2 胰腺疾病动物模型

胰腺疾病常见有胰腺炎、糖尿病和胰腺癌等类型。目前, 这几种胰腺疾病的发病机制尚未研究清楚。建立有效的动物模型可用于研究胰腺疾病发生机制, 以及开发治疗药物。以下简单介绍用于 PSCs 作用机制研究的 3 种胰腺疾病相关的动物模型。

2.1 胰腺炎动物模型

急性胰腺炎 (acute pancreatitis) 是由多种因素导致胰腺出现水肿、坏死等局部炎性损伤的急腹症之一。引起该病的常见原因主要是过量饮酒和胆石症^[10]。急性胰腺炎的发病率逐年增高, 其总体死亡率约为 5%^[11]。目前, 急性胰腺炎的发病机制尚未研究清楚, 建立有效的动物模型可用于研究其发病机制和治疗药物。用于急性胰腺炎造模的实验动物主要有大鼠、小鼠、负鼠、豚鼠、犬、猫、兔、猪、猴等^[12]。

常用的急性胰腺炎动物模型是 Toll 样受体 4 基因缺失小鼠模型。研究发现, PSCs 在胰腺炎发生发展过程中发挥着重要作用。乙醇、脂多糖等能被病原体相关模式分子识别受体如 Toll 样受体结合, 激活免疫系统,

同时也激活 PSCs, 释放损伤相关模式分子等内源性物质, 造成机体炎性因子水平升高和胰腺组织损伤^[13]。活化的 PSCs 还作用于促炎 M1 型巨噬细胞和免疫调节 M2 型巨噬细胞。而巨噬细胞在急性和慢性胰腺炎中发挥着不同的潜在作用。组织学观察发现, M2 型巨噬细胞与 PSCs 紧密靠近; 与 M1 型巨噬细胞占主导地位的急性胰腺炎不同, 小鼠和人类慢性胰腺炎中胰腺组织被 M2 型巨噬细胞浸润。此外, 小鼠和人的 PSCs 都是白细胞介素 4 受体 α (interleukin-4 receptor α , IL-4R α) 配体的来源, 并且可促进 M2 型巨噬细胞极化。M2 型巨噬细胞反过来又能有效地激活 PSCs, 促进“前馈”过程, 该过程提示巨噬细胞在胰腺纤维化中发挥关键作用。值得注意的是, 在患有骨髓特异性 IL-4R α 缺失的小鼠或在确诊疾病后接受 IL-4R α 药物抑制剂治疗的小鼠中, 胰腺纤维化减少^[14], 因此通过抑制 M2 型巨噬细胞的激活来减少 PSCs 的活化, 可能降低慢性胰腺炎的发病率。

2.2 糖尿病动物模型

糖尿病 (diabetes mellitus) 是一个日益严重的公共卫生健康问题, 其类型主要有 1 型糖尿病、2 型糖尿病和妊娠期糖尿病等, 其中 2 型糖尿病占 90% 以上, 给社会带来沉重的医疗负担^[15]。因此, 建立理想的糖尿病动物模型将为其发病机制研究、并发症治疗及临床新药研发奠定基础。目前, 常用于构建糖尿病模型的实验动物有大鼠、小鼠和斑马鱼等^[16]。

糖尿病模型 OLETF 大鼠的研究发现, PSCs 在糖尿病发生发展过程中发挥的主要作用与氧化应激和纤维化相关。在糖尿病模型 OLETF 大鼠中, β 细胞会因为胰岛素分泌过程高耗氧而变得缺氧, 尤其是在氧气供应不足时^[17], PSCs 在缺氧期间被激活, 通过触发腺泡细胞中异常的 Ca^{2+} 信号, 降低 ATP 水平, 引起腺泡坏死, 诱导胰腺外分泌腺组织损伤; 同时在胰岛中观察到 α -SMA 阳性的 PSCs 细胞数量增加, 并通过细胞凋亡促进胰岛 β 细胞死亡^[18]。另外, PSCs 被炎性细胞因子如转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 激活后, 细胞内压力迅速升高, 细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 发生磷酸化, 进一步促进 TGF- β 1 和胶原蛋白的分泌^[19]。用丝裂原激活的细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK) 和 p38 MAPK 的拮抗剂可抑制应激诱导

的 α -SMA表达和细胞增殖,促进胰腺损伤和胰岛 β 细胞凋亡,致使糖尿病症状加剧^[19]。

2.3 胰腺癌动物模型

胰腺癌(pancreatic cancer)是恶性程度最高的癌症之一,多发病于老年人群中。全球范围内每年有超过41.16万的胰腺癌患者,且其5年生存率低于5%^[20]。胰腺癌难以诊断,往往在疾病发展到晚期才被发现。目前,胰腺癌的致病原因尚不清楚。构建胰腺癌动物模型是研究胰腺癌的有效方法。常见的胰腺癌动物模型构建方法包括向免疫缺陷鼠体内移植来源于患者的胰腺癌组织、化学诱导法如腹腔注射致癌物N-亚硝基双胺。最近有研究发现,利用Cre-Lox技术,可针对小鼠胰腺中原癌基因*Kras*和抑癌基因*Trp53*的内源等位基因进行突变,再通过不断杂交繁育得到转基因LSL-*Kras*^{G12D/+};LSL-*Trp53*^{R172H/+};Pdx-1-Cre(KPC)小鼠;KPC小鼠是研究最多的胰腺导管癌基因工程小鼠模型之一^[21-22]。

在原位胰腺癌模型小鼠中,活化的PSCs类似于癌症相关成纤维细胞,通过改变胰腺基质细胞的ECM以及分泌各种细胞因子和趋化因子发挥重要作用。胰腺癌的基质主要由PSCs沉积的胶原纤维以及其他细胞(如肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和内皮细胞)和非细胞(即ECM)组成,这些基质成分可以介导PSCs与癌细胞之间的相互作用。PSCs被激活后将产生大量的 α -SMA蛋白,改变了原有的胰腺基质细胞和ECM,更适应癌细胞的增殖和扩散^[23]。活化的PSCs还通过介导核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路的下游信号通路增加趋化因子CXCL12受体表达,抑制细胞毒性T(CD8⁺T)细胞浸润,从而使癌细胞发生免疫逃逸,最终影响胰腺癌的生物学行为和临床结果^[24]。

3 利用胰腺疾病动物模型开展的PSCs机制研究

研究发现,在胰腺疾病小鼠模型的胰腺病理组织及血清中都能检测出ECM蛋白以及促炎性因子,且其水平明显高于正常组织^[3]。而PSCs经过活化后具有很强的增殖和迁移能力,并且可以分泌大量ECM蛋白和促炎性因子,促进纤维化和炎性水平上升,改变了胰腺组织的微环境,最终导致胰腺疾病的发生^[25]。为了更好地研究胰腺疾病的发生发展机制,有学者通过构

建胰腺疾病动物模型探讨了PSCs对胰腺疾病发生发展的作用及其可能的机制。

3.1 PSCs与纤维化

纤维化可发生于多种器官,主要病理特征为器官组织内纤维结缔组织增多,实质细胞减少,持续进展可致器官结构破坏和功能减退,乃至衰竭,严重威胁健康和生命。在TGF- β 1过表达的转基因小鼠培养过程中,发现小鼠具有慢性胰腺炎的组织形态学特征,如细胞外基质相关蛋白积累^[26]。在2型糖尿病Goto-kakizaki大鼠模型实验后期,通过天狼星红染色观察到胰岛纤维化;胰岛纤维化在 β 细胞衰竭的进展中发挥重要作用,因为它诱导 β 细胞凋亡,从而导致分泌胰岛素的功能进一步受损^[27]。胰腺的纤维组织主要由I型和III型胶原组成,PSCs是人类和实验动物模型胰腺纤维化中I型和III型胶原蛋白的主要来源,且会分泌大量炎性因子;同时TGF- β 1会促进大量ECM蛋白合成,纤维化水平不断提高,最终引发2型糖尿病和急性胰腺炎,甚至胰腺癌的症状^[28]。目前,胰腺纤维化的发病机制尚未完全阐明,但其很可能来源于PSCs的激活,PSCs活化会导致大量的ECM产生,激活状态的PSCs会快速增殖、迁移扩散,进而导致胰腺实质细胞减少,胰腺外分泌腺和胰岛呈纤维化状态^[29]。简而言之,PSCs的激活会造成胰腺纤维化,胰腺纤维化会使胰腺功能丧失,甚至协助胰腺癌细胞扩散,从而加速胰腺疾病的发生发展。

3.2 PSCs与氧化应激

在2型糖尿病小鼠模型中,高血糖症状会提高氧化应激水平,刺激PSCs活化,加剧胰腺纤维化进程,并且伴随着活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增高,胰腺纤维化水平也升高^[30]。氧化应激与癌症、2型糖尿病及自身免疫性疾病的发生机制有关^[31]。在正常小鼠模型中,氧化应激会刺激PSCs的活化,从而分泌一些细胞因子和趋化因子,激活一氧化氮信号通路,导致急性胰腺炎等炎性疾病的发生;同时,这些活性分子可直接作用于DNA、蛋白质、脂类,也可作为功能性分子信号,激活细胞内多种应激敏感信号通路,比如MAPK信号通路,与PSCs的增殖、迁移能力及胰岛素抵抗和胰腺 β 细胞功能受损密切相关^[32]。从SD大鼠分离出的原代PSCs在缺氧条件下被激活,激活的PSCs与胰岛 β 细胞共培养后,可以促进 β 细胞凋亡^[18];激活的PSCs还可以通过影响胰岛素信号转导通路,间接抑制 β 细胞功能。 β 细胞受损后,胰岛素

分泌水平降低,分泌高峰延迟,血糖波动加剧,因而难以控制餐后血糖的迅速上升,对 β 细胞造成更为显著的损害^[33]。PSCs被认为在氧化应激信号通路中起到传感器的作用,通过至少两个第二信使向下游发送压力信号,最终导致胰腺疾病及并发症的发生发展^[34-35]。

3.3 PSCs与炎症反应

炎症代表了一个基本的生物学自我修复过程,通过诱导各种修复机制恢复组织的稳态。但是这种恢复可能不会充分发生,从而导致持续的应激反应,使炎症反应持续存在并且被放大,该过程导致组织功能显著改变,体内平衡机制出现系统性和持续性紊乱,致使组织损伤^[36]。在急性胰腺炎和2型糖尿病模型大鼠的血清中检测到炎症标志物的水平明显升高,且伴随着胰腺组织水肿出血、纤维化加剧和胰岛素分泌减少的现象,使胰腺处于长期炎症状态。在慢性炎症和氧化应激的作用下,静息状态下的PSCs被组织的炎症微环境持续激活,活化的PSCs激活转录因子NF- κ B进入细胞核,诱导许多基因转录,调控不同的细胞,其中就包括巨噬细胞和中性粒细胞等炎症细胞的激活并迅速增殖。NF- κ B途径还与氧化应激有关,活化的NF- κ B可诱导产生细胞代谢产物,刺激大量PSCs激活,进一步加剧炎症和氧化应激,并促进胰腺细胞凋亡,从而导致氧化应激诱导的细胞功能障碍^[20]。此外,活化的PSCs也会刺激巨噬细胞活化,巨噬细胞在组织炎症的调节中发挥主要作用,巨噬细胞表现出介于两个极端之间的表型:M1型(促炎性)和M2型(消炎性)。活化的PSCs又会通过旁分泌方式,分泌一些炎症因子和趋化因子,例如白细胞介素IL-6、IL-8和TNF- α 等^[14],这些细胞因子促使机体炎症反应往不可控的方向发展,使慢性炎症持续存在并放大,加快了急性胰腺炎和2型糖尿病的进程,甚至最终转变成胰腺癌。

4 通过靶向抑制PSCs治疗胰腺疾病的研究前景

动物模型和临床研究均发现,活化的PSCs在胰腺疾病发生发展中起着重要作用。不同胰腺疾病的动物模型研究发现,PSCs发挥作用主要是在纤维化、氧化应激和炎症反应等方面,提示通过抑制PSCs活化可能预防各类胰腺疾病的发生,并据此研发相关的治疗药物。未来的研究内容可以包括:开展体内和体外实验,探究PSCs对胰腺的损伤和致病机制;开展体内实验,

通过药物干预探究PSCs对纤维化、氧化应激和炎症反应的作用;探究PSCs的状态,或者通过提取胰腺疾病模型动物体内的原代PSCs,在体外实验研究其与胰腺其他细胞的互作关系,进一步验证PSCs对胰腺功能的影响,为研究和开发此类疾病的治疗药物提供基础。

4.1 从纤维化的角度治疗胰腺疾病

PSCs的激活是胰腺纤维化发展的重要过程,可导致2型糖尿病和胰腺导管癌^[37]。活化的PSCs已被认为是胰腺纤维化的关键起始分子,也是胰腺癌的重要标志^[38]。一些特定的植物提取物可作为新的抗纤维化制剂,例如姜黄素(curcumin)可用于靶向治疗胰腺纤维化以及抑制PSCs活化和肿瘤干细胞增殖,其治疗原理是抑制血小板衍生生长因子的增殖诱导作用,使活化的PSCs和肿瘤干细胞停滞在G₀/G₁期,最终使细胞凋亡,减少细胞外基质蛋白的产生^[39]。此外,鞣花酸(ellagic acid)能够抑制c-Raf/MAPK/ERK和PI3K/AKT下游信号通路的激活,这些信号通路对PSCs细胞增殖和迁移很重要;而且鞣花酸可以通过降低 α -SMA蛋白和ECM前胶原I、III型蛋白水平,使PSCs失活^[40]。因此,抗纤维化疗法已被确定为是一种通过靶向抑制PSCs活化治疗胰腺疾病的新策略。

4.2 从氧化应激的角度治疗胰腺疾病

从氧化应激的角度调控PSCs达到治疗胰腺疾病的目的,主要是通过抗氧化剂干预来实现。已知大量饮酒会造成急性胰腺炎,其原理是乙醇通过氧化应激反应来激活PSCs,促使PSCs的细胞膜脂质过氧化,以及总超氧化物歧化酶过量表达。而绿茶中的绿茶多酚主要活性成分表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化和抗癌作用。研究发现,EGCG预处理可以抑制乙醇诱导的体外PSCs活化^[41]。已知乙醇能够显著增加 α -SMA蛋白(I型前胶原)表达,激活TGF- β 1,并诱导p38 MAPK磷酸化。而EGCG治疗能够显著降低所有这些因子的生成,并且彻底消除p38 MAPK磷酸化^[41]。此外有研究证实,EGCG可以通过调节线粒体氧化应激和炎症反应,下调HSCs中促纤维化标志物(如I型胶原蛋白、纤连蛋白和 α -SMA)的基因表达,减弱ROS诱导的肝细胞死亡,从而减少肝纤维化^[42]。而HSCs和PSCs的性质类似,提示EGCG也可能通过减少胰腺纤维化,预防胰腺疾病的发生。

另有研究发现,白藜芦醇(resveratrol)通过下调microRNA21(miR21)表达、增加张力蛋白同

源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 蛋白水平来阻止ROS诱导的PSCs活化、侵袭、迁移和糖酵解; 进一步研究证明, 白藜芦醇可以通过抑制ROS/miR21介导的PSCs活化和糖酵解来抑制胰腺癌细胞的侵袭和迁移, 达到靶向治疗胰腺癌的目的^[43]。

4.3 从炎症反应的角度治疗胰腺疾病

静息状态的PSCs因机体处于炎症状态而被激活, 活化的PSCs通过NF- κ B途径分泌一些趋化因子和生长因子, 从而介导和加剧炎症。所以, 通过诱导PSCs凋亡, 可抑制NF- κ B的稳定性和转录活性, 加速组织从炎症反应中恢复。例如常见的糖尿病治疗药物二甲双胍, 通过重编程PSCs和肿瘤相关巨噬细胞可减轻胰腺癌患者炎症, 对活化的PSCs具有抑制增殖和促凋亡的作用, 可减弱NF- κ B途径造成的炎症反应, 一定程度上减缓了2型糖尿病的症状^[44]。姜黄素类似物L49H37通过降低ERK1/2激酶的磷酸化水平, 下调p21水平, 导致G₀/G₁期依赖性细胞周期停滞, 抑制活化的PSCs增殖并诱导凋亡, 减少了众多炎症因子的旁分泌, 降低组织炎症损伤水平^[45]。

综上所述, 在急性胰腺炎、2型糖尿病和胰腺导管癌动物模型中, 活化的PSCs能够促进胰腺组织纤维化, 在氧化应激信号通路中发挥传导功能, 促使机体炎症反应, 导致胰腺疾病的发生。因此, 靶向抑制PSCs的活化能够减轻胰腺细胞的损伤, 减缓胰腺疾病的发生发展, 这可能为治疗胰腺疾病提供了一种新思路。

[作者贡献]

魏迅: 文献检索及分析, 初稿撰写;

江霞、郑羽旋、张乐文: 文献检索及分析;

周正宇: 提供论文撰写思路, 进行文章审阅和修改。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 凤振宁, 金世柱. 急性胰腺炎动物模型构建方法的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29(4):388-391. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2020.04.006.
- [2] PANG T C Y, WILSON J S, APTE M V. Pancreatic stellate cells: what's new? [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2017, 33(5):366-373. DOI:10.1097/MOG.0000000000000378.
- [3] BYNIGERI R R, JAKKAMPUDI A, JANGALA R, et al. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(3):382-405. DOI:10.3748/wjg.v23.i3.382.
- [4] SHERMAN M H. Stellate cells in tissue repair, inflammation, and cancer[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2018, 34:333-355. DOI:10.1146/annurev-cellbio-100617-062855.
- [5] OMARY M B, LUGEA A, LOWE A W, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):50-59. DOI:10.1172/JCI30082.
- [6] LI W, LIU H, QIAN W K, et al. Hyperglycemia aggravates microenvironment hypoxia and promotes the metastatic ability of pancreatic cancer[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2018, 16:479-487. DOI:10.1016/j.csbj.2018.10.006.
- [7] HUANG Q, HUANG M, MENG F, et al. Activated pancreatic stellate cells inhibit NK cell function in the human pancreatic cancer microenvironment[J]. Cell Mol Immunol, 2019, 16(1):87-89. DOI:10.1038/s41423-018-0014-2.
- [8] APTE M V, HABER P S, APPELGATE T L, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture[J]. Gut, 1998, 43(1):128-133. DOI:10.1136/gut.43.1.128.
- [9] 许小凡, 吴楠, 朱林佳, 等. 昆明小鼠胰腺星状细胞分离培养与鉴定[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(7):564-567. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.07.004.
- [10] MANDALIA A, WAMSTEKER E J, DIMAGNO M J. Recent advances in understanding and managing acute pancreatitis [J]. F1000Research, 2018, 7: F1000 Faculty Rev-F1000 Faculty 959. DOI:10.12688/f1000research.14244.2.
- [11] 杨晶晶, 张丹, 陈嘉屿. 急性胰腺炎动物模型研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(11):984-990. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2019.11.16.
- [12] 张林焱, 白明, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的急性胰腺炎动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12):196-201. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20211104.
- [13] HABTEZION A. Inflammation in acute and chronic pancreatitis [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2015, 31(5):395-399. DOI:10.1097/MOG.0000000000000195.
- [14] LIU G Y, DÖPPLER H, NECELA B, et al. Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal Metaplasia through NF- κ B and MMPs[J]. J Cell Biol, 2013, 202(3):563-577. DOI:10.1083/jcb.201301001.
- [15] SEMWAL D K, KUMAR A, ASWAL S, et al. Protective and therapeutic effects of natural products against diabetes mellitus via regenerating pancreatic β -cells and restoring their dysfunction[J]. Phytother Res, 2021, 35(3):1218-1229. DOI:10.1002/ptr.6885.
- [16] 江霞, 钱豪杰, 魏迅, 等. 斑马鱼糖尿病模型的构建及应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(6):547-552. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2020.06.016.
- [17] KIM J W, PARK S Y, YOU Y H, et al. Suppression of ROS production by exendin-4 in PSC attenuates the high glucose-induced islet fibrosis[J]. PLoS One, 2016, 11(12):e0163187. DOI:10.1371/journal.pone.0163187.
- [18] KIM J J, LEE E, RYU G R, et al. Hypoxia increases β -cell death by activating pancreatic stellate cells within the islet[J]. DiabetesMetabJ, 2020, 44(6):919-927. DOI:10.4093/dmj.2019.0181.
- [19] XU X F, LIU F, XIN J Q, et al. Respective roles of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members in pancreatic stellate cell activation induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(2):365-373. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.176.

- [20] JIN G H, HONG W L, GUO Y Y, et al. Molecular mechanism of pancreatic stellate cells activation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer[J]. J Cancer, 2020, 11(6):1505-1515. DOI: 10.7150/jca.38616.
- [21] 宗毅, 廖泉, 赵玉沛. 胰腺癌实验动物模型的建立与应用[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(1):210-211. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.01.078.
- [22] LEE J W, KOMAR C A, BENGSCHE F, et al. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: The KPC model (*LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre*), its variants, and their application in immuno-oncology drug discovery[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2016, 73: 14.39.1-14.39.20. DOI: 1002/cpph.2.
- [23] POTHULA S P, XU Z H, GOLDSTEIN D, et al. Key role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 381(1):194-200. DOI:10.1016/j.canlet.2015.10.035.
- [24] GARG B, GIRI B, MODI S, et al. NF- κ B in pancreatic stellate cells reduces infiltration of tumors by cytotoxic T cells and killing of cancer cells, via up-regulation of CXCL12[J]. Gastroenterology, 2018, 155(3): 880-891.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.05.051.
- [25] LI C X, CUI L H, YANG L, et al. Pancreatic stellate cells promote tumor progression by promoting an immunosuppressive microenvironment in murine models of pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2020, 49(1):120-127. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001464.
- [26] VOGELMANN R, RUF D, WAGNER M, et al. Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF- β 1 transgenic mouse model[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(1): G164-G172. DOI: 10.1152/ajpgi.2001.280.1.G164.
- [27] LI F F, CHEN B J, LI W, et al. Islet stellate cells isolated from fibrotic islet of goto-kakizaki rats affect biological behavior of beta-cell[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016:6924593. DOI:10.1155/2016/6924593.
- [28] OHNISHI H, MIYATA T, YASUDA H, et al. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor- β 1 regulation of pancreatic stellate cellular functions[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8873-8878. DOI: 10.1074/jbc.M309698200.
- [29] WYNN T A, RAMALINGAM T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. Nat Med, 2012, 18(7):1028-1040. DOI:10.1038/nm.2807.
- [30] YANG S S, LIAN G J. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. Mol Cell Biochem, 2020, 467(1-2): 1-12. DOI:10.1007/s11010-019-03667-9.
- [31] RENDRA E, RIABOV V, MOSSEL D M, et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes[J]. Immunobiology, 2019, 224(2):242-253. DOI:10.1016/j.imbio.2018.11.010.
- [32] GERBER P A, RUTTER G A. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26(10): 501-518. DOI: 10.1089/ars.2016.6755.
- [33] QIN W J, LI C, ZHENG W, et al. Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(37):39839-39854. DOI:10.18632/oncotarget.5674.
- [34] AHMAD W, IJAZ B, SHABBIRI K, et al. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/RNS generation[J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 76. DOI:10.1186/s12929-017-0379-z.
- [35] JAKUBOWSKA M A, FERDEK P E, GERASIMENKO O V, et al. Nitric oxide signals are interlinked with calcium signals in normal pancreatic stellate cells upon oxidative stress and inflammation[J]. Open Biol, 2016, 6(8): 160149. DOI: 10.1098/rsob.160149.
- [36] SUZUKI K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise[J]. Biomolecules, 2019, 9(6):223. DOI:10.3390/biom9060223.
- [37] SHIMIZU K. Pancreatic stellate cells: molecular mechanism of pancreatic fibrosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23 (Suppl 1):S119-S121. DOI:10.1111/j.1440-1746.2007.05296.x.
- [38] RAMAKRISHNAN P, LOH W M, GOPINATH S C B, et al. Selective phytochemicals targeting pancreatic stellate cells as new anti-fibrotic agents for chronic pancreatitis and pancreatic cancer[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(3):399-413. DOI:10.1016/j.apsb.2019.11.008.
- [39] MASAMUNE A, SUZUKI N, KIKUTA K, et al. Curcumin blocks activation of pancreatic stellate cells[J]. J Cell Biochem, 2006, 97(5):1080-1093. DOI:10.1002/jcb.20698.
- [40] CECI C, TENTORI L, ATZORI M G, et al. Ellagic acid inhibits bladder cancer invasiveness and in vivo tumor growth[J]. Nutrients, 2016, 8(11):744. DOI:10.3390/nu8110744.
- [41] ASAUMI H, WATANABE S, TAGUCHI M, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells[J]. Eur J Clin Invest, 2006, 36(2): 113-122. DOI: 10.1111/j. 1365-2362.2006.01599.x.
- [42] SHEN K Z, FENG X W, SU R, et al. Epigallocatechin 3-gallate ameliorates bile duct ligation induced liver injury in mice by modulation of mitochondrial oxidative stress and inflammation[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0126278. DOI:10.1371/journal.pone.0126278.
- [43] BHATT J K, THOMAS S, NANJAN M J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus[J]. Nutr Res, 2012, 32(7): 537-541. DOI: 10.1016/j.nutres.2012.06.003.
- [44] INCIO J, SUBOJ P, CHIN S M, et al. Metformin reduces desmoplasia in pancreatic cancer by reprogramming stellate cells and tumor-associated macrophages[J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0141392. DOI: 10.1371/journal.pone.0141392.
- [45] GUNDEWAR C, ANSARI D, TANG L G, et al. Antiproliferative effects of curcumin analog L49H37 in pancreatic stellate cells: a comparative study[J]. Ann Gastroenterol, 2015, 28(3): 391-398.

(收稿日期: 2021-04-26 修回日期: 2021-12-17)

(本文编辑: 张俊彦)



杨斐, 副研究员, 硕士研究生导师, 长期从事实验动物学科研、教学和管理工 作。现 任 复 旦 大 学 国 家 级 基 础 医 学 实 验 教 学 中 心 医 学 实 验 动 物 学 教 学 团 队 负 责 人, 兼 任 上 海 市 实 验 动 物 标 准 化 技 术 委 员 会 副 主 任 委 员、《实 验 动 物 与 比 较 医 学》杂 志 编 委, 历 任 上 海 市 实 验 动 物 学 会 副 理 事 长、中 国 实 验 动 物 学 会 理 事。复 旦 大 学 实 验 动 物 学 专 业 硕 士 研 究 生 毕 业 后, 曾 作 为 高 级 访 问 学 者 赴 美 国 杜 克 大 学、新 加 坡 国 立 大 学、欧 洲 实 验 小 鼠 资 源 库 (EMMA)、Charles River Laboratory 欧 洲 分 部 等 国 际 专 业 机 构 进 修。主 持 实 验 动 物 学、比 较 医 学 等 省 部 级 及 以 上 科 技 项 目 15 项, 获 得 发 明 专 利 6 项, 主 编 国 家 及 行 业 规 划 教 材 4 部, 在 核 心 期 刊 发 表 学 术 论 文 30 余 篇, 获 得 软 件 著 作 权 5 项。荣 获 2015 年 第 27 届 上 海 市 优 秀 发 明 选 拔 赛 优 秀 发 明 奖、2015 年 度 “复 旦-复 星”上 海 医 学 院 优 秀 教 师 奖。

环境丰富对英国短毛猫应激相关指标的改善作用

陈鸿婷¹, 杨斐², 胡樱²

(1. 复旦大学实验动物科学部, 上海 200032; 2. 复旦大学基础医学院, 上海 200032)

[摘要] **目的** 研究环境丰富对实验用英国短毛猫应激反应的缓解作用。**方法** 将14只实验用英国短毛猫按有无环境丰富干预措施随机分为福利组和对照组, 每组7只, 实验共持续11周。测定并分析比较各组实验猫的血液生理生化指标、神经内分泌指标、免疫学指标, 评价不同组别的应激水平。**结果** 福利组的平均红细胞体积明显小于对照组 ($P < 0.05$), 淋巴细胞百分比极明显大于对照组 ($P < 0.01$), 中性粒细胞百分比极明显小于对照组 ($P < 0.01$)。另外, 福利组的尿素、肌酐、球蛋白和总蛋白水平均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 肾上腺素、多巴胺两项指标也明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而Ⅱ型干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ /IL-4 比值、IL-2/IL-4 比值、IFN- γ /IL-5 比值和 IL-2/IL-5 比值均高于对照组; 其中 IFN- γ 、IL-2、IFN- γ /IL-5 比值和 IL-2/IL-5 比值差异明显 ($P < 0.05$), IL-5 差异极明显 ($P < 0.01$)。**结论** 采取环境丰富的干预措施能够有效提高实验猫的福利水平, 缓解应激反应。

[关键词] 实验动物福利; 环境丰富; 应激; 英国短毛猫

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0152-07

Improving Effect of Environmental Enrichment on Stress-related Indicators of British-shorthair Cats

CHEN Hongting¹, YANG Fei², HU Ying²

(1. Department of Laboratory Animal Science, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YANG Fei, E-mail: yfdwbfd@fudan.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of environmental enrichment on alleviating stress in laboratory British-shorthair cats. **Methods** A total of fourteen laboratory British-shorthair cats were randomly divided into welfare group ($n = 7$) and control group ($n = 7$) according to the presence of environmental enrichment interventions which lasted for 11 weeks. The hematological and blood biochemical, neuroendocrine and immunological parameters of each group were measured and compared to evaluate the stress level of different groups. **Results** The mean corpuscular volume in the welfare group

[基金项目] 上海市科技发展基金创新行动计划项目: 实验用猫生物学特性研究(19140900200)

[作者简介] 陈鸿婷(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: hongtingchen1989@163.com

[通信作者] 杨斐(1968—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: yfdwbfd@fudan.edu.cn

was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), the percentage of lymphocyte was extremely higher than that in the control group ($P < 0.01$), and the neutrophilic percentage was extremely lower than that in the control group ($P < 0.01$). In addition, the levels of carbamide, creatinine, globulin, total protein in the welfare group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$); the adrenaline and dopamine indicators in the welfare group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), while interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ /IL-4 ratio, IL-2/IL-4 ratio, IFN- γ /IL-5 ratio and IL-2/IL-5 ratio of the welfare group were higher than those of control group; among them, IFN- γ , IL-2, IFN- γ /IL-5 ratio and IL-2/IL-5 ratio were significantly different ($P < 0.05$), and IL-5 difference was extremely significant ($P < 0.01$). **Conclusion** The environmental enrichment interventions can effectively improve the welfare level of laboratory cats and reduce the biological costs of stress.

[Key words] Laboratory animal welfare; Environmental enrichment; Stress; British-shorthair cats

猫在解剖学、生理学以及对疾病的反应方面与人类相似, 因此被广泛应用于生理学、毒理学、免疫学及神经科学等实验研究^[1]。随着实验猫使用范围的不断扩大, 公众对生物医学研究中实验猫的饲养管理等问题也越来越重视, 尤其在一些欧美国家相关研究日益增多^[2-3]。目前, 国内人工饲养实验猫多采用单一的普通笼养的饲养方式^[4], 虽然此方法经济实用、便于管理, 但是长期笼养会限制猫的天性和自然行为表达, 从而导致严重的健康问题, 最终影响动物实验结果的可靠性、科学性。因此, 本研究从美国引进遗传特征稳定并具有代表性的英国短毛猫原种, 在实验室饲养环境下封闭繁殖育种, 并根据英国短毛猫的生物特性及感官体验设计相应的环境丰富 (environmental enrichment) 措施, 分别对单一笼养饲养环境和福利化饲养环境下实验用英国短毛猫的血浆学、神经内分泌及免疫学进行比较分析, 探索环境丰富对实验用英国短毛猫健康状况的影响, 从而帮助研究者认识到提高与改善实验猫福利水平的重要性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

从美国引进的英国短毛猫原种在复旦大学实验动物科学部 [SYXK (沪) 2020-0032] 普通级实验室环境下封闭繁殖饲养, 育成后随机选取 14 只 2 周岁左右的普通级实验用英国短毛猫。其中雌性 9 只, 体质量约 2.5~2.8 kg; 雄性 5 只, 体质量约 3.8 kg。实验室采用自然通风和照明, 室温控制在 18~26 °C, 相对湿度为 40%~70%。每只实验猫单笼饲养, 笼具规格为 82 cm×70 cm×76 cm; 每个饲养笼内放置单独的食盆、水碗、砂盆, 笼底置有清洁托盘, 笼内另有规格为 65 cm×30 cm×35 cm 的栖息处。整个实验流程获

得复旦大学实验动物伦理委员会审核批准 (伦理审批号: 202106052Z)。

1.2 动物饲料及饲喂方法

按照定时定量的原则饲喂室内成猫全价粮 (法国皇家宠物食品有限公司产品, Royal Canin I27), 每日上午 8:15 定时饲喂, 按照各猫体质量定量饲喂。饮用水为煮沸消毒冷却的自来水, 每日上午 8:40 和下午 16:00 更换两次, 24 h 持续供应。

1.3 主要仪器与试剂

ProCyte Dx 自动化血细胞分析仪和 Catalyst Dx 生化分析仪为美国 IDEXX Laboratories 公司产品; InnoScan 300 Microarray Scanner 荧光扫描仪为法国 Innopsys 公司产品; Thermo Scientific Wellwash Versa 芯片洗板机为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

肾上腺素、去甲肾上腺素、皮质醇、多巴胺检测用 ELISA 试剂盒, 以及 Quantibody® Feline Cytokine Array 1 蛋白芯片试剂盒 (含 Cy3-链霉亲和素小管和检测抗体混合物小管) 均为美国 RayBiotech 公司产品。

1.4 实验分组及干预措施

14 只实验用英国短毛猫随机分为有环境丰富干预的福利组及未干预的对照组。其中, 福利组实验猫雌性 4 只 (平均 2.8 kg), 雄性 3 只 (平均 3.8 kg); 对照组实验猫雌性 5 只 (平均 2.5 kg), 雄性 2 只 (平均 3.8 kg)。福利组的环境丰富干预方式包括: (1) 笼内环境丰富, 即每个笼内右侧放置隐藏纸箱 (30 cm×30 cm×25 cm) 及猫抓板各 1 个; (2) 笼外环境丰富, 即笼外活动区域放置有猫抓板、爬架、乒乓球等玩具, 并设置高处空间栖息处, 且实验台紧贴窗户, 可供猫观察到窗外环境, 给予感官刺激; (3) 社交环境丰富, 即实验者每日与每只实验猫个体交流、爱抚、互动 10 min, 并利用激光笔、钓鱼竿和实验猫群体互动 30

min, 此外每日实验猫群体笼外自由活动 60 min, 以促进其个体相互之间的社会性交往(雌猫与雄猫群体分开活动)。对照组实验猫除每日实验者为其检查个体状况及护理外(每只 5 min), 均待在各自笼内, 无以上环境丰富措施。对照组和福利组实验猫虽然在同一饲养间内, 但是两组间相互隔离, 互不接触, 以尽可能减轻对照组的额外压力和影响。实验总时间为 11 周(77 d)。

1.5 血液标本采集与处理

整个环境丰富干预实验结束当日, 在实验猫清醒状态下, 经股静脉采集全血 2 mL。取其中 0.5 mL 全血经 EDTA-K2 抗凝后, 于 2 h 内测定血液生理学指标。另取 0.5 mL 全血经肝素抗凝后, 于 2 h 内测定血液生化指标。最后 1 mL 全血经 EDTA-K2 抗凝后, 于 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清于 -80 °C 冻存, 待用于神经内分泌和免疫学指标的测定。

1.6 血液学指标测定

使用 IDEXX ProCyt Dx 自动化血细胞分析仪测定 21 项血液学相关指标: 白细胞数、淋巴细胞数、单核细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数、嗜碱性粒细胞数、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、中性粒细胞百分比、嗜酸性粒细胞百分比、嗜碱性粒细胞百分比、红细胞比容、红细胞数、血红蛋白含量、网织红细胞数、平均红细胞体积、红细胞平均血红蛋白浓度、红细胞平均血红蛋白含量、血小板数量、平均血小板体积、血小板比积。

1.7 血液生化指标测定

使用 IDEXX Catalyst Dx 生化分析仪测定 12 项血液生化指标: 白蛋白、碱性磷酸酶、丙氨酸转氨酶、尿素、钙、胆固醇、肌酐、球蛋白、葡萄糖、磷、总胆红素和总蛋白的含量。

1.8 神经内分泌指标测定

采用 ELISA 法测定 4 项神经内分泌指标: 肾上腺素、去甲肾上腺素、皮质醇、多巴胺水平, 按试剂盒说明书操作。

1.9 免疫学指标测定

采用蛋白芯片技术测定 5 项细胞因子: II 型干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5 水平。按蛋白芯片试剂盒说明书严格操作: 首先将蛋白芯片取出, 在室温平衡 20~30 min 后打开, 放在室温干燥 1~2 h; 同时从 -80 °C 冰箱取出备用血清样本, 放置于室温使其融

解; 然后向蛋白芯片上的每个孔中加 100 μ L 样品稀释液, 室温摇床上孵育 1 h, 封闭定量抗体芯片; 抽去每个孔中的样品稀释液, 添加 100 μ L 的标准液和样品到孔中, 在摇床上 4 °C 孵育过夜, 使用 Thermo Scientific Wellwash Versa 芯片洗板机清洗玻片; 离心检测抗体混合物小管, 加入 1.4 mL 样品稀释液混匀并快速离心, 添加 80 μ L 的检测抗体到每个孔中, 室温摇床上孵育 2 h 后清洗玻片; 然后离心 Cy3-链霉亲和素小管, 加入 1.4 mL 样品稀释液混匀并快速离心, 添加 80 μ L 的 Cy3-链霉亲和素到每个孔中, 室温避光摇床上孵育 1 h 后清洗玻片; 使用 InnoScan 300 激光扫描仪扫描信号(采用 Cy3 或者绿光通道, 激发光波长为 532 nm)。

1.10 统计学分析

将各测定指标的原始数据录入 Microsoft[®] Excel for Mac 整理后, 运用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 8 软件做进一步统计分析, 去除极端值后以独立样本 *t* 检验比较组间差异。数据结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 环境丰富影响实验猫的血液学指标

血液学指标检测结果见表 1。红细胞方面, 福利组实验猫的平均红细胞体积明显低于对照组 ($P < 0.05$), 其余指标无明显差异 ($P > 0.05$)。白细胞方面, 福利组实验猫的淋巴细胞百分比极明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而中性粒细胞百分比极明显低于对照组 ($P < 0.01$), 其余指标则无明显差异 ($P > 0.05$)。在血小板方面, 两组间各项指标均无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.2 环境丰富影响实验猫的血液生化指标

血液生化指标测定结果见表 2。与对照组相比较, 福利组实验猫的血液尿素、肌酐、球蛋白、总蛋白含量均明显降低 ($P < 0.05$), 其余指标的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 环境丰富影响实验猫的神经内分泌指标

神经内分泌指标测定结果显示, 福利组实验猫的肾上腺素和多巴胺两项指标均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 其余指标差异不明显 ($P > 0.05$), 见图 1A。

2.4 环境丰富影响实验猫的免疫学指标

免疫学指标检测结果显示, 与对照组相比较, 环境丰富后福利组实验猫的血清 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ /IL-4 比值、IFN- γ /IL-5 比值、IL-2/IL-4 比值和 IL-2/IL-5 比值均有所升高, 其中 IFN- γ 、

表1 环境丰富对实验猫血液学指标的影响

Table 1 Effect of environmental enrichment on hematological parameters in laboratory cats

检测指标	对照组 (n=7)	福利组 (n=7)
WBC $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	8.41 $\pm$ 2.67	7.96 $\pm$ 3.27
LYMPH $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	1.58 $\pm$ 0.33	2.50 $\pm$ 0.91
MONO $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	0.40 $\pm$ 0.20	0.25 $\pm$ 0.06
NEUT $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	5.82 $\pm$ 2.21	4.34 $\pm$ 2.04
EO $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	0.54 $\pm$ 0.27	0.81 $\pm$ 0.56
BASO $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	0.07 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.04
LYMPH %	20.09 $\pm$ 5.37	32.41 $\pm$ 6.36**
MONO %	4.59 $\pm$ 1.30	3.37 $\pm$ 0.63
NEUT %	67.87 $\pm$ 4.99	54.33 $\pm$ 6.22**
EO %	6.53 $\pm$ 2.95	9.11 $\pm$ 3.56
BASO %	0.93 $\pm$ 0.58	0.77 $\pm$ 0.36
HCT %	37.26 $\pm$ 3.99	36.46 $\pm$ 3.09
RBC $\omega/(10^{12} \cdot L^{-1})$	9.33 $\pm$ 1.10	9.81 $\pm$ 1.23
HGB $\omega/(g \cdot L^{-1})$	12.70 $\pm$ 1.31	12.54 $\pm$ 0.94
RETIC $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	9.27 $\pm$ 4.80	8.87 $\pm$ 4.61
MCV $\omega/(fL)$	40.01 $\pm$ 2.10	37.34 $\pm$ 1.88*
MCHC $\omega/(g \cdot L^{-1})$	34.11 $\pm$ 0.83	34.44 $\pm$ 0.65
MCH $m/(pg)$	13.64 $\pm$ 0.88	12.89 $\pm$ 0.81
PLT $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	312.86 $\pm$ 92.76	211.57 $\pm$ 74.30
MPV $\omega/(fL)$	13.01 $\pm$ 1.15	14.19 $\pm$ 1.76
PCT %	0.40 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.11

注: WBC即白细胞数, LYMPH即淋巴细胞数, MONO即单核细胞数, NEUT即中性粒细胞数, EO即嗜酸性粒细胞数, BASO即嗜碱性粒细胞数, LYMPH%即淋巴细胞百分比, MONO%即单核细胞百分比, NEUT%即中性粒细胞百分比, EO%即嗜酸性粒细胞百分比, BASO%即嗜碱性粒细胞百分比, HCT即红细胞比容, RBC即红细胞数, HGB即血红蛋白含量, RETIC即网织红细胞数, MCV即平均红细胞体积, MCHC即红细胞平均血红蛋白浓度, MCH即红细胞平均血红蛋白含量, PLT即血小板数量, MPV即平均血小板体积, PCT即血小板比积。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表2 环境丰富对实验猫血液生化指标的影响

Table 2 Effect of environmental enrichment on blood biochemical parameters in laboratory cats

检测指标	对照组 (n=7)	福利组 (n=7)
ALB $\rho/(g \cdot L^{-1})$	33.14 $\pm$ 1.46	33.29 $\pm$ 1.03
ALKP $z/(U \cdot L^{-1})$	43.00 $\pm$ 10.53	42.86 $\pm$ 7.41
ALT $z/(U \cdot L^{-1})$	70.00 $\pm$ 19.38	60.29 $\pm$ 9.28
UREA $c/(mmol \cdot L^{-1})$	6.50 $\pm$ 1.26	5.06 $\pm$ 0.95*
CA $c/(mmol \cdot L^{-1})$	2.40 $\pm$ 0.07	2.34 $\pm$ 0.07
CHOL $c/(mmol \cdot L^{-1})$	2.48 $\pm$ 0.53	2.65 $\pm$ 0.57
CREA $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	120.00 $\pm$ 16.24	102.29 $\pm$ 7.28*
GLOB $\rho/(g \cdot L^{-1})$	50.43 $\pm$ 6.21	43.71 $\pm$ 2.71*
GLU $c/(mmol \cdot L^{-1})$	6.17 $\pm$ 1.08	5.43 $\pm$ 0.55
PHOS $c/(mmol \cdot L^{-1})$	1.73 $\pm$ 0.12	1.68 $\pm$ 0.17
TBIL $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	3.14 $\pm$ 1.25	2.14 $\pm$ 0.35
TP $\rho/(g \cdot L^{-1})$	83.45 $\pm$ 5.53	77.14 $\pm$ 2.80*

注: ALB即白蛋白, ALKP即碱性磷酸酶, ALT即丙氨酸转氨酶, UREA即尿素, CA即钙, CHOL即胆固醇, CREA即肌酐, CLOB即球蛋白, GLU即葡萄糖, PHOS即磷, TBIL即总胆红素, TP即总蛋白。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

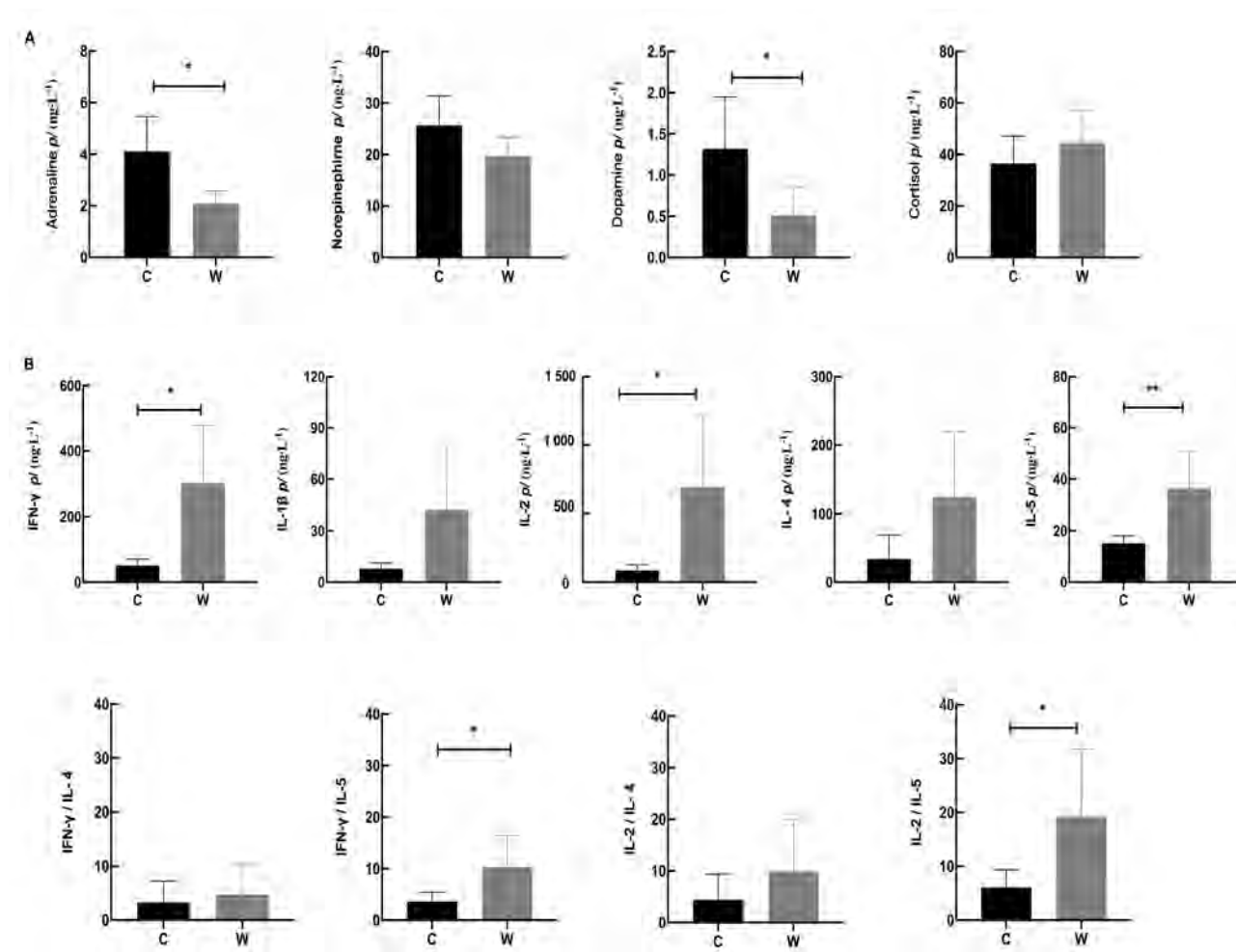
IL-2、IFN- γ /IL-5比值和IL-2/IL-5比值差异明显 ($P < 0.05$), IL-5差异极明显 ($P < 0.01$), 而其余指标差异尚无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图1B。

3 讨论

饲养环境对于实验猫福利具有重要的影响。长期笼养环境下的实验猫, 一方面缺乏足够的活动空间或丰富的设施满足其玩耍、探索、躲避的天性, 另一方面还缺乏与同伴及人类互动的机会而不能满足其社交需求^[5]。当实验动物需求不能得到满足时, 其福利状况就会受到不同程度的损害, 由此将导致物质及能量代谢的生理变化和情绪不稳定等心理问题^[6-7]。因此, 本实验通过设置笼内隐藏箱、笼外活动区域的攀爬设施及玩具、增加个体相互间游戏玩耍以及和人类互动交流建立信任关系的机会等环境丰富干预措施, 满足实验猫的躲避、玩耍、探索、社交等需求, 然后从血液学、神经内分泌学、免疫学三个方面评估这些环境丰富福利措施对实验猫健康状况的影响。

本实验结果显示, 对照组的肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺水平均高于福利组, 其中肾上腺素和多巴胺水平的组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明对照组实验猫的交感-肾上腺髓质系统更敏感, 机体更可能处于高度警觉的应急状态, 而福利组实验猫的交感-肾上腺髓质系统则相对稳定在低活性状态。对于笼养环境下的猫而言, 其应激原主要来自于贫瘠环境以及缺乏与同伴及人类之间的相互交流^[8]。环境丰富可以通过大脑影响整个神经系统, 改变多种神经递质的活动, 从而缓解实验动物的恐惧、焦虑等不良情绪^[9]。一些研究发现, 大鼠缺乏环境刺激或剥夺社交行为, 以及小鼠遭遇社交失败, 均会对正常大脑功能产生不利影响, 常伴有多巴胺分泌活动增加等方面的神经化学改变^[10-11]。此外, 肾上腺素、多巴胺水平更高的实验猫在面对日常实验操作如采血等应激时, 更容易处于持续的惊恐和紧张状态, 表现出更多的反抗情绪及行为, 不仅使实验操作更加困难, 而且增加反抗本身对动物造成身心伤害的可能, 例如恐惧、紧张等情绪的生理反应多表现为交感神经系统活动的相对亢进^[12], 会进一步威胁实验猫的健康状况。

众所周知, 机体在应激反应中, 神经-内分泌-免疫系统之间存在着广泛而精细的相互调节作用, 细胞因子即是其中主要的交汇点。由图1可知, 对照组实验猫的血清IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5水平均低于福利组, 其中IFN- γ 、IL-2、IL-5的组间差异均



注: Adrenaline 即肾上腺素, Norepinephrine 即去甲肾上腺素, Dopamine 即多巴胺, Cortisol 即皮质醇, IFN-γ 即干扰素-γ, IL-1β 即白细胞介素-1β, IL-2 即白细胞介素-2, IL-4 即白细胞介素-4, IL-5 即白细胞介素-5。c 为对照组, w 为福利组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 环境丰富对实验猫神经内分泌指标(A)和免疫学指标(B)的影响

Figure 1 Effect of environmental enrichment on neuroendocrine parameters (A) and immunological parameters (B) in laboratory cats

有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-1β 是机体固有免疫应答过程中最为重要的调节因子之一; IFN-γ 及 IL-2 则是 Th1 型细胞因子的主要代表, 共同促进细胞介导的免疫应答; 同时, IL-4 介导 Th2 细胞亚群分化, 分化后的 Th2 细胞能分泌 IL-4 和 IL-5 等细胞因子, 从而增强抗体介导的体液免疫应答^[13]。因此, 本研究结果提示, 对照组实验猫的免疫功能相较于福利组受到抑制, 而当机体免疫功能受到抑制时, 很容易并发传染性疾病或诱发各种躯体-神经性疾病。处于长期应激状态下的猫, 由于免疫抑制增加了其对传染性疾病如猫上呼吸道感染的易感性, 不仅威胁实验动物的健康, 同时也增加了实验室环境下爆发传染性疾病的风险, 甚至对实验人员健康造成威胁^[14]。另外, 机体的适应性免疫平衡通常取决于 Th1 型细胞因子介导的细胞免疫与

Th2 型细胞因子介导的体液免疫之间的平衡 (即 Th1/Th2 比值), 长期 (慢性) 应激可通过改变 Th1 和 Th2 细胞因子的平衡促使轻度慢性炎症反应的发生^[15]。由图 1 可知, 对照组实验猫的血清 Th1/Th2 即 IFN-γ/IL-4、IL-2/IL-4、IFN-γ/IL-5、IL-2/IL-5 比值均低于福利组, 其中 IFN-γ/IL-5、IL-2/IL-5 比值在两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这说明不同饲养环境可导致 Th1/Th2 细胞因子平衡的改变, 对照组 Th1/Th2 较福利组低, 说明其免疫平衡更偏向于 Th2。据文献报道, 慢性心理应激可导致 Th1/Th2 平衡偏向于 Th2 介导的体液免疫, 并可增加过敏性疾病的易感性, 甚至促进肿瘤生长^[16]。

应激对免疫功能的作用还受体内白细胞分布的影响^[17]。本实验中白细胞相关指标的检测结果显示, 对

照组实验猫的淋巴细胞数、淋巴细胞百分比低于福利组,中性粒细胞及中性粒细胞百分比高于福利组,其中淋巴细胞百分比和中性粒细胞百分比的组间差异有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。白细胞分布常被用来评估机体的应激反应:中性粒细胞(N)增加、淋巴细胞(L)降低造成N:L比值增加,这种现象在大部分脊椎动物的应激反应中均可观察到^[18]。综合以上白细胞相关指标及细胞因子的变化,本研究结果提示对照组实验猫的免疫功能,无论是固有免疫还是适应性免疫,均与福利组相比受到了明显抑制,而免疫功能的相对低下不仅意味着机体对疾病的抵抗力下降,更容易受到感染,而且免疫反应受到抑制并不能够节省能量,实际上反而需要额外的能量消耗,如免疫抑制因子的合成与释放及细胞凋亡的过程中均需要消耗能量。曾有研究者指出,从进化的角度来看,由应激所导致的机体专门消耗能量来抑制淋巴细胞启动强大的适应性免疫反应是毫无意义的^[19],因为这需要机体调用本该用于其他生物学功能的贮备能量来对应激,同时也改变了机体内各种生物活动之间的资源分配,这将直接影响动物的福利状况。因此,为进一步了解不同饲养环境下实验猫能量代谢的变化,本实验还测定了血液生理生化指标。

分析表1可知,在红细胞方面,对照组实验猫的平均红细胞体积显著大于福利组($P < 0.05$),红细胞数和血红蛋白含量等其余指标在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。红细胞的生成与营养物质的吸收与利用有关,而慢性应激会引起机体营养代谢紊乱^[20]。本实验中对照组与福利组的饲喂方式及饲料品种一致,并且各组红细胞数和血红蛋白含量等其余红细胞相关指标无显著差异。因此推测,对照组实验猫的平均红细胞体积大于福利组,可能是由于应激引起交感神经兴奋,肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺等神经递质合成与释放增加,机体的微量元素如铁、维生素B₁、维生素B₁₂、叶酸多用于合成以上神经递质,从而不足以促进红细胞成熟所致。若长此以往,将可能导致实验猫幼幼细胞贫血^[21]。另外,对照组实验猫的血小板数也略多于福利组($P = 0.059$)。据文献报告,慢性应激状态下的大鼠凝血功能及血小板活性增强,进而影响心血管的发生^[22]。由表2可知,对照组实验猫的尿素、肌酐、球蛋白和总蛋白水平平均显著高于福利组($P < 0.05$)。当机体细胞处于应激状态时,肌蛋白降解促使肌酸从组织中释放并代谢生成肌酐。同时,尿素和肌酐还是判断肾功能的重要指标,若均高于正

常值则表明其肾功能受到损害^[23]。血浆蛋白质主要包括白蛋白、球蛋白和纤维蛋白原,通常将白蛋白、球蛋白、总蛋白三者结合起来分析,若三者都以同一比率升高,则可能是由于水的相对缺乏引起血浆蛋白浓度升高。本研究中对照组实验猫的血清总蛋白和球蛋白含量显著高于福利组,但两组之间的白蛋白水平相近,这说明其主要差异为球蛋白的差异,而机体免疫功能受到抑制时可能引起球蛋白水平升高。由此可见,对照组实验猫的营养、能量代谢途径相较于福利组也发生改变以对应激。

本研究通过为实验猫设置隐藏箱、攀爬设施及玩具、增加其与同伴及实验人员社交互动的机会等环境丰富干预措施,满足实验猫躲避、玩耍、探索及社交需求。例如,躲藏是猫与生俱来的固有行为表现,尤其在笼养环境下观察到的这种行为表现已被国外相关研究^[24]报告过。Gourkow等^[25]观察到如果没有为笼养环境下的猫提供隐藏箱,它们将会试图通过打翻砂盆来建立可供其隐藏的地方。在本实验的日常管理中也观察到此现象,而这种行为的发生不仅会给同伴造成额外的应激压力,还给实验室的管理带来不便。玩耍、探索、与同伴及人类互动等活动不仅满足实验猫的行为需求,而且促进其日常运动量的适度增加。虽然运动作为应激原也会引起应激反应,但定期适度运动有助于利用机体的短期应激反应提高其对抗应激的能力^[26]。通过适度运动来激活体内短期应激反应,可以显著增强机体免疫力,并减少肿瘤的发生率,这将有助于提高实验猫抵抗病原微生物感染的能力^[27]。

综上所述,本研究从血液学、神经内分泌、免疫学三个方面分析了环境丰富对缓解实验用英国短毛猫应激作用的影响,结果发现不同饲养环境下的实验用英国短毛猫的血液生理生化、神经内分泌、免疫学部分指标均有明显的改变。研究结果提示,相较于普通单一笼养环境,环境丰富下的实验猫的机体应激水平较低,免疫功能相对未受到抑制;而普通单一笼养环境会使实验猫的部分生理功能受到损害,威胁实验猫的身心健康。此外,本研究所采取的环境丰富措施易操作且经济便利,能够保证实验猫的生理健康,更好地实现实验动物福利的完整内涵,确保实验结果的科学性及可靠性,具有较高的应用价值与现实意义。然而,由于目前实验猫的行为学研究尚无可靠量表及专用的观察分析仪器,国内外实验猫行为学的相关研究也很少见。因此,本研究在实验猫行为学方面尚存在不足,这也是今后需要进一步探讨的方向。

[作者贡献]

陈鸿婷：设计实验方案，开展具体实验研究，获取实验数据，进行数据分析及解释，起草并撰写研究论文。

杨斐：提出研究思路，对实验设计方案、整个实验过程以及论文进行关键性修改和把关。

胡樱：协助开展具体实验研究，帮助获取实验数据及数据分析。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王亮, 付君言, 周子娟, 等. 人类疾病猫模型的制作与应用[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2):248-252. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.019.
- [2] GERET C, RIOND B, CATTORI V, et al. Housing and care of laboratory cats: from requirements to practice[J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2011, 153(4): 157-164. DOI: 10.1024/0036-7281/a000175.
- [3] ROCHLITZ I. Recommendations for the housing and care of domestic cats in laboratories[J]. Lab Anim, 2000, 34(1): 1-9. DOI:10.1258/002367700780577939.
- [4] 滑志民, 蔡旋, 张似青, 等. 实验用猫的繁育[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2020(1):38-39. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.01.016.
- [5] ELLIS S L H. Environmental enrichment: practical strategies for improving feline welfare[J]. J Feline Med Surg, 2009, 11(11): 901-912. DOI:10.1016/j.jfms.2009.09.011.
- [6] LEWEJOHANN L, SCHWABE K, HÄGER C, et al. Impulse for animal welfare outside the experiment[J]. Lab Anim, 2020, 54(2):150-158. DOI:10.1177/0023677219891754.
- [7] STELLA J L, CRONEY C C. Environmental aspects of domestic cat care and management: implications for cat welfare[J]. Sci World J, 2016, 2016:6296315. DOI:10.1155/2016/6296315.
- [8] AMAT M, CAMPS T, MANTECA X. Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications[J]. J Feline Med Surg, 2016, 18(8):577-586. DOI:10.1177/1098612X15590867.
- [9] 李军延, 刘帅. 实验动物环境丰富化[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3):327-330. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.020.
- [10] BARKER T H, GEORGE R P, HOWARTH G S, et al. Assessment of housing density, space allocation and social hierarchy of laboratory rats on behavioural measures of welfare[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185135. DOI:10.1371/journal.pone.0185135.
- [11] HOLLY E N, DEBOLD J F, MICZEK K A. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area[J]. Psychopharmacology (Berl), 2015, 232(24): 4469-4479. DOI: 10.1007/s00213-015-4082-z.
- [12] BROOM D M, JOHNSON K G. Stress and animal welfare: key issues in the biology of humans and other animals[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2019: 99-130. DOI:10.1007/978-3-030-32153-6.
- [13] SCHILLER M, BEN-SHAANAN T L, ROLLS A. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(1):20-36. DOI:10.1038/s41577-020-0387-1.
- [14] STELLA J, CRONEY C, BUFFINGTON T. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats[J]. Appl Anim Behav Sci, 2013, 143(2-4): 157-163. DOI: 10.1016/j.applanim.2012.10.014.
- [15] DHABHAR F S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology[J]. Neuroimmunomodulation, 2009, 16(5):300-317. DOI:10.1159/000216188.
- [16] HOU N, ZHANG X, ZHAO L Y, et al. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(4): 471-476. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.08.101.
- [17] DHABHAR F S, MILLER A H, MCEWEN B S, et al. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones[J]. J Immunol, 1996, 157(4): 1638-1644. DOI:10.1006/cimm.1996.0224.
- [18] DAVIS A K, MANEY D L, MAERZ J C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists[J]. Funct Ecol, 2008, 22(5): 760-772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x.
- [19] DHABHAR F S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful[J]. Immunol Res, 2014, 58(2-3):193-210. DOI:10.1007/s12026-014-8517-0.
- [20] 何钢华, 廖金娥, 陈结文, 等. 幼年期实验用食蟹猴血液学指标测定与比较[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10):66-73. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.012.
- [21] GEORGIEFF M K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(2): 614S-620S. DOI:10.1093/ajcn/85.2.614S.
- [22] 宋洪涛, 武忠, 张瑞霞, 等. 慢性应激对大鼠凝血功能和血小板活化的影响及电针的干预作用[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(3):304-307. DOI:10.3969/j.issn.1006-9771.2017.03.011.
- [23] 刘长金, 余承高. 医学生理学[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2009.
- [24] VINKE C M, GODIEN L M, VAN DER LEIJ W J R. Will a hiding box provide stress reduction for shelter cats? [J]. Appl Animal Behav Sci, 2014, 160: 86-93. DOI: 10.1016/j.applanim. 2014. 09.002.
- [25] SMITH G E, CHOUINARD P A, BYOSIERE S-E. If I fits I sits: A citizen science investigation into illusory contour susceptibility in domestic cats (*Felis silvestris catus*) [J]. Appl Anim Behav Sci, 2021, 240: 105338. DOI: 10.1016/j.applanim. 2021. 105338.
- [26] GÓMEZ-GALÁN M, FEMENÍA T, ÅBERG E, et al. Running opposes the effects of social isolation on synaptic plasticity and transmission in a rat model of depression[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0165071-e. DOI:10.1371/journal.pone.0165071.
- [27] DHABHAR F S, SAUL A N, DAUGHERTY C, et al. Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma[J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(1):127-137. DOI:10.1016/j.bbi.2009.09.004.

(收稿日期: 2021-07-30 修回日期: 2021-12-08)

(本文编辑: 张俊彦, 洪怡)

离体豚鼠回肠法应用于骨肽类注射剂中组胺类物质检测

吴 畅^{1,2}, 李晓洁², 吴殷因^{1,2}, 王 瑶², 汪玉馨², 宗卫峰², 孟长虹², 陆益红^{1,2}

(1. 徐州医科大学药物分析教研室, 徐州 221004; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019)

[摘要] **目的** 评价离体豚鼠回肠法检测骨肽类注射剂中组胺类物质的效果, 以及代替猫降压物质检查法的可行性。**方法** 按照《中国药典》2020版中组胺类物质检查法(即离体豚鼠回肠法), 对5家企业共7批骨肽类注射剂进行组胺类物质检查, 同时利用猫降压物质检查法对其结果进行确证和比较。**结果** 用离体豚鼠回肠法进行组胺类物质检查发现有3批制剂结果呈阴性, 与猫降压物质检查法的检查结果一致; 另外4批制剂结果可疑, 对照猫降压物质检查结果是3批制剂可疑, 1批制剂呈阳性。离体豚鼠回肠法检查结果与猫降压物质检查法对于可疑结果的检出较为一致, 总体结果一致率为85.7% (6/7)。**结论** 离体豚鼠回肠法与猫降压物质检查法的结果基本一致, 可用于骨肽类制剂中组胺类物质筛查及研究; 同时, 骨肽类制剂标准中建议增订降压物质或组胺类物质检查项。

[关键词] 离体豚鼠回肠法; 骨肽类注射剂; 组胺类物质检查; 猫降压物质检查

[中图分类号] Q95-33; **R-332** **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0159-07

Application of Isolated Guinea Pig Ileum Method for Detection of Histamine Substances in Osteopeptide Injections

WU Chang^{1,2}, LI Xiaojie², WU Yinnan^{1,2}, WANG Yao², WANG Yuxin², ZONG Weifeng², MENG Changhong², LU Yihong^{1,2}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China)

Correspondence to: MENG Changhong, E-mail: hyjy@sina.com; LU Yihong, E-mail: yihonglu@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the detection of the histamine substances in osteopeptide injections by the isolated guinea pig ileum method, and to explore the feasibility of replacing cat depressor substances method. **Methods** According to the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, the histamine substances in 7 batches of osteopeptide injections were detected from 5 enterprises by isolated guinea pig ileum method. The results were compared with the test method of cat depressor substances. **Results** By the isolated guinea pig ileum method, the histamine substances in 3 batches of preparations were negative, which was consistent with the results of the test method of cat depressor substances. The results of the other 4 batches of preparations were suspicious; while the examination results of depressor substances in cat were 3 batches suspicious and 1 batch positive. The overall consistency rate of the two methods was 85.7% (6/7). **Conclusion** The results of isolated guinea pig ileum method is almost the same as the test of cat depressor substances, which can be used for the screening and study of histamines in osteopeptide injections. It is suggested to add the inspection items of the test of depressor substances or histamines in the standard of osteopeptide injections.

[Key words] Isolated guinea pig ileum method; Osteopeptide injections; Histamine substances test; Test of cat depressor substances

[基金项目] 江苏省实验动物协会2021年实验动物研究课题: 药品中组胺类物质测定用动物模型比较研究(DWXH202108)

[作者简介] 吴 畅(1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物质量控制研究。E-mail: wuchang0703@163.com

[通信作者] 孟长虹(1966—), 女, 硕士, 主任药师, 主要从事药理毒理研究。E-mail: hyjy@sina.com

陆益红(1977—), 女, 博士, 主任药师, 主要从事药品质量分析及安全性评价。E-mail: yihonglu@163.com

组胺是一种活性胺化合物,在体内与组胺H1受体结合后,可致血管舒张、血压下降、支气管与胃肠道平滑肌收缩等生理反应^[1]。药品中的降压物质主要是指组胺等能引起血压下降的生物胺类物质,其含量超过规定的限度时,临床上可引起生命体出现血压下降、冷汗甚至休克等症状。猫降压物质检查法是指向实验猫静脉中注射限值剂量的供试品及组胺对照品,比较供试品与对照品引起的降压程度,以此判定供试品中所含降压物质的限值是否符合规定。而组胺类物质检查法是将一定浓度的供试品和组胺对照品依次注入离体豚鼠回肠浴槽内,比较供试品与对照品所致的回肠收缩幅度,以判定供试品中组胺类物质含量是否符合规定。

《中国药典》1985年版首次收录了降压物质检查法,当时使用的实验动物为猫或犬,一直沿用至2000年版;2005年版则把所使用的实验动物明确为猫,删除了犬;发展至2010年版,在保留原有的降压物质检查法的基础上,《中国药典》第二部附录《化学药物注射剂安全性检查法应用指导原则》增加了组胺类物质检查项;《中国药典》2015年版首次收录了组胺类物质检查法(即豚鼠离体回肠收缩法),并明确猫降压物质检查法可以作为该方法的补充和相互替代方法。然而目前相关研究和报告较少,豚鼠离体回肠收缩法的选择尚缺少相关标准依据。

骨肽类制剂是一类由动物骨骼提炼而成且具有生物活性的多组分生化药物,部分制剂品种在制备工艺中还添加了全蝎、甜瓜子等动植物提取成分^[2],因其具有消炎镇痛等作用,临床主要用于骨质疏松症、骨质增生、骨折及类风湿性关节炎等疾病的治疗^[2]。近年来,不良反应监测系统显示,骨肽注射液会引起皮肤及其附件、呼吸系统等方面的不良反应,症状包括皮疹、发热、胸闷、呼吸困难、血压下降等^[3],并因其不良反应发生率较高而被录入国家重点监控药品目录。

多组分生化药物大多来自动物脏器的提取物,来源复杂,存在组分不明、结构不清的问题,有可能因脏器离体后组织出现自溶现象混入组胺、类组胺样具有降压作用、致敏反应的活性物质,从而影响药物的治疗效果并产生不良反应^[4]。为保障用药安全,针对上述存在安全风险的制剂及原料应建立降压物质检查项^[5-6],但由于我国实验用猫一直难以标准化供给,实验结果很容易受到较多因素干扰。本实验拟探讨采用组胺类物质检查法(即离体豚鼠回肠法)替代猫降

压物质检查法^[7]的一致性和可行性,以期能够为骨肽类注射剂的药品质量控制和安全性评价,以及相关标准的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

离体器官仪 ALC-MPA2000 购自上海奥尔科特生物科技有限公司。

1.2 受试品

复方骨肽注射液来自江苏企业A和B,各1批;骨肽注射液来自湖北企业C、黑龙江企业D和E,各1批;注射用骨肽来自黑龙江企业D,1批;注射用骨瓜提取物来自黑龙江企业E,1批。

1.3 试剂

磷酸组织胺对照品(批号150510-201313)购自中国食品药品检定研究院;氯化钠(批号20200602)、氯化钾(批号20150618)、氯化钙(批号20120413)、氯化镁(批号F20111220)、磷酸氢二钠(批号20170306)、硫酸阿托品(批号1806161)、碳酸氢钠(批号N15C009)和葡萄糖(批号20170928)均购自国药集团化学试剂有限公司;戊巴比妥钠(批号20140221)购自美国Sigma-Aldrich公司;肝素钠注射液(批号1200402)购自南京新百药业有限公司;生理盐水(即0.9%氯化钠)注射液(批号8K82B1)购自中国大冢制药有限公司;注射用水(批号1810414)购自上海信谊金朱药业有限公司。

1.4 实验动物

实验用普通级虎皮猫体质量约3 kg,雄性,1只;普通级豚鼠体质量约280~340 g,雌雄各半,共42只。实验动物均购自无锡恒泰实验动物养殖有限公司[SCXK(苏)2020-0003],其中实验用豚鼠的实验动物质量合格证编号为HT00277。动物饲养于江苏省食品药品监督检验研究院普通环境[SYXK(苏)2017-0062]。本研究中动物实验方案经江苏省食品药品监督检验研究院实验动物福利伦理委员会审核批准(审查编号为JSIFDC2020-05)。

1.5 组胺类物质检查方法

参照《中国药典》2020年版中第四部通则第1146条组胺类物质检查法(即离体豚鼠回肠法)进行实验^[8-9]。取体质量在280~320 g、禁食24 h的健康合格成年豚鼠,随机分为7组,每组6只。用静脉注射空气法迅速处死豚鼠,立即剖腹取出远端回肠,固定于离

体器官仪 ALC-MPA2000 中。在离体器官仪的恒温水浴槽中事先放入一定量的临用时新配制的回肠肌营养液（取氯化钠 160.0 g、氯化钾 4.0 g、氯化钙 2.0 g、氯化镁 1.0 g 与磷酸氢二钠 0.10 g，加纯化水 700 mL 使溶解，再加入适量注射用水，使成 1 000 mL。从上述配制溶液中取 50.0 mL，与硫酸阿托品 0.5 mg、碳酸氢钠 1.0 g、葡萄糖 0.5 g 混匀，再加注射用水，使成 1 000 mL，调节 pH 值至 7.3，即制得）^[8]。随后连续通入混合气体（该气体由 95% O₂ 和 5% CO₂ 组成），维持 35℃ 的恒定温度。精密称取磷酸组胺对照品适量，按组胺计算，加水溶解成每 1 mL 中含 1.0 mg 的溶液，配制成一定量的组胺对照品溶液。精密量取上述组胺对照品溶液适量，用氯化钠注射液按高、低剂量组（d_{s2}、d_{s1}）配成两种浓度的稀释液，高剂量 d_{s2} 应不致使回肠收缩达到极限，低剂量 d_{s1} 所致反应值约为高剂量的一半，调节剂量使反应可以重复出现。注入体积为 0.2~0.5 mL，高低剂量的比值（r）为 1:0.5。调节剂量，使低剂量能引起回肠收缩，高剂量不致使回肠收缩达极限，且高低剂量所致回肠的收缩应有明显差别。

由于实验中供试品溶液 d_T（各批次骨肽注射液样品按实验要求稀释后得到的溶液）的浓度与低剂量组胺对照溶液的浓度直接相关，具体计算公式如下：一般以人每千克体质量可接受的组胺限量（0.1 μg/kg）和人每千克体质量每小时临床最大用量的供试品剂量

的比值计算注射剂含组胺类物质的检查限值。检查限值（L）的计算公式如下：L=K/M。其中 K 为人每千克体质量可接受的组胺限量（0.1 μg/kg），M 为人每千克体质量每小时的最大供试品剂量。以 60 kg 作为人均体质量计算。结合检查限值（L）和低剂量组胺溶液的浓度（CSL）计算出供试品的最小有效稀释浓度（MVC），计算公式如下：MVC=CSL/L。式中：CSL 为低剂量组胺溶液的质量浓度（μg/mL）；L 为供试品组胺限值（μg/mg）。骨肽注射液的原溶液浓度较低，其对应的低剂量组胺溶液浓度引起豚鼠回肠收缩不明显，因此低、高剂量对照品采用计算值的 2 倍浓度进样。结合制剂的临床剂量及检查要求，具体实验的供试品溶液 d_T 的给药浓度见表 1。

在每段豚鼠回肠中按照 d_{s2}、d_{s1}、d_T、d_T、d_{s1}、d_{s2} 的顺序分别注入对照品稀释液和供试品溶液，这两种溶液的注入体积应相等。如果供试品溶液引起了一定程度上的回肠收缩，则将第 2 个注入剂量 d_{s1} 与第 4 个注入剂量 d_T，第 5 个注入剂量 d_{s1} 与第 3 个注入剂量 d_T 所致的反应值各自进行比较。若两次注入的 d_T 所致反应值均不大于 d_{s1} 所致反应值的一半，即认为供试品组胺类物质检查呈阴性结果；若 d_T 所致反应值大于 d_{s1} 所致反应值的一半且小于 d_{s1} 所致反应值，认为供试品组胺类物质检查结果可疑；若 d_T 所致反应值大于 d_{s1} 所致反应值，则判定供试品组胺类物质检查呈阳性结果。

表 1 离体豚鼠回肠法组胺类物质检查实验中给药剂量
Table 1 Experimental dose of histamine-like substances test by the isolated guinea pig ileum method

制剂名	临床剂量/ (mg·kg ⁻¹)	限值/ (μg·mg ⁻¹)	低剂量组胺溶液	高剂量组胺溶液	给药质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	给药体积/ mL
			质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)		
骨肽注射液	1.67	0.06	0.6	1.2	5.0	0.40
复方骨肽注射液	2.50	0.04	0.6	1.2	15.0	0.40
注射用骨肽	1.67	0.06	1.0	2.0	16.7	0.25
注射用骨瓜提取物	3.33	0.03	1.0	2.0	33.0	0.25

1.6 降压物质检查方法

参照《中国药典》2020 年版中第四部通则第 1145 条降压物质检查法进行实验^[8-9]。用戊巴比妥钠将实验用猫麻醉后，固定于保温手术台上，分离气管，在一侧颈动脉插入连接测压计的动脉插管，管内充满适宜的抗凝剂溶液，以记录血压。在一侧股静脉内插入静脉插管，供注射药液用。全部手术完毕后根据药典要求检查猫的灵敏度，当实验用猫经检查后对降压物质的灵敏度符合药典要求，则可进行下一步实验，即

取对照品溶液（d_s）剂量按 0.10 μg/kg 体质量计算，供试品溶液（d_T）以临床单次用药剂量的 0.2~5 倍作为降压剂量限值^[9]。具体给药剂量和静脉注射体积见表 2。按照 d_s、d_T、d_T、d_s 这样的次序注射 4 个剂量为一组，然后将第一与第三个剂量，第二与第四个剂量所致的反应值分别进行比较。如果剂量 d_T 所致的反应值均不大于剂量 d_s 所致反应值的一半，判定供试品的降压物质检查结果呈阴性。否则应按上述次序继续注射一组 4 个剂量，并按相同方法将两组内各对 d_s、d_T 剂量

所致的反应值分别进行比较。如果 d_T 所致反应值大于 d_S 所致反应值的一半且小于 d_S 所致反应值，认为供试品降压物质检查结果可疑。如果 d_T 剂量所致的反应值大于 d_S 剂量所致的反应值，则认为供试品的降压物质检查呈阳性结果。因此，结合制剂的临床剂量及检查要求，具体实验的给药剂量见表2。

表2 猫降压物质检查实验给药剂量
Table 2 Experimental dose of cat depressor substance test

制剂名	给药剂量/ (mg·kg ⁻¹)	临床剂量/ (mg·kg ⁻¹)	临床剂量倍数	给药体积/(mL·kg ⁻¹)
骨肽注射液	2.5	1.67	1.5	0.5
复方骨肽注射液	1.5	2.50	0.6	1.0
注射用骨肽	2.5	1.67	1.5	0.5
注射用骨瓜提取物	1.0	3.33	0.3	1.0

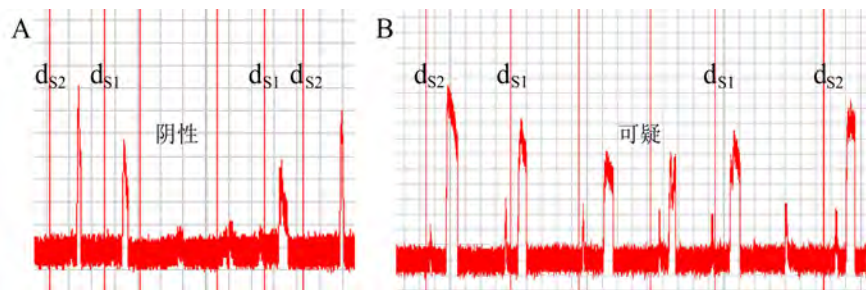
2 结果

2.1 组胺类物质检查结果

将5家企业共7批骨肽类注射剂分别根据表1中给药剂量进行实验，得出的结果显示有3批制剂的组胺类物质检查结果呈阴性，4批制剂结果可疑。截取其中较为典型的回肠收缩反应值变化进行比较可见，相较于

于回肠收缩反应不明显的阴性批次，可疑批次会出现较为明显的回肠收缩反应，见图1。

其中企业A的复方骨肽注射液、企业C和E的骨肽注射液、企业E的注射用骨瓜提取物致回肠收缩的反应值均大于组胺对照品所致反应值的一半，且小于组胺对照品所致反应值，提示结果可疑。具体结果见表3。



注：A，注射用骨肽（批次D-2）致豚鼠回肠收缩反应值变化；B，复方骨肽注射液（批次A-1）致豚鼠回肠收缩反应值变化。 d_{S2} 为高剂量对照品稀释液， d_{S1} 为低剂量对照品稀释液，通过高低剂量比较检测实验模型的灵敏度。

图1 两种典型骨肽类注射剂中组胺类物质的检查结果比较

Figure 1 Comparison of histamine-like substance test between the two typical osteopeptide injections

表3 7批骨肽类注射剂用组胺类物质检查法检测结果
Table 3 Results of histamine-like substance test in 7 batches of osteopeptide injections

企业	制剂名	批次	豚鼠回肠收缩反应值/mm				d_T 与 $d_S/2$ 、 d_S 比较
			d_S	d_T	d_T	d_S	
A	复方骨肽注射液	A-1	57.07	47.39	46.29	57.31	$1/2d_S < d_T < d_S$
B	复方骨肽注射液	B-1	42.24	19.95	20.82	46.85	$d_T < 1/2d_S$
C	骨肽注射液	C-1	33.06	24.25	20.94	30.86	$1/2d_S < d_T < d_S$
D	骨肽注射液	D-1	49.45	3.47	9.54	43.38	$d_T < 1/2d_S$
	注射用骨肽	D-2	24.29	6.07	0.87	58.12	$d_T < 1/2d_S$
E	骨肽注射液	E-1	40.22	18.39	19.54	34.47	$1/2d_S < d_T < d_S$
	注射用骨瓜提取物	E-2	70.53	50.70	44.08	87.07	$1/2d_S < d_T < d_S$

注： d_S 为对照品稀释液， d_T 为供试品溶液。按照 d_S 、 d_T 、 d_T 、 d_S 这样的次序注射4个剂量为一组。

2.2 降压物质检查结果

降压物质检查法实验中给药剂量参照表2。检测结果表明,同上述组胺类物质检查法检测结果可疑的4批骨肽类制剂,企业A的复方骨肽注射液在其等效剂量的0.6倍、企业C的骨肽注射液在其等效剂量的1.5倍时降压实验结果可疑,企业E的骨肽注射液在其等效剂量的1.5倍、注射用骨瓜提取物在其等效剂量的

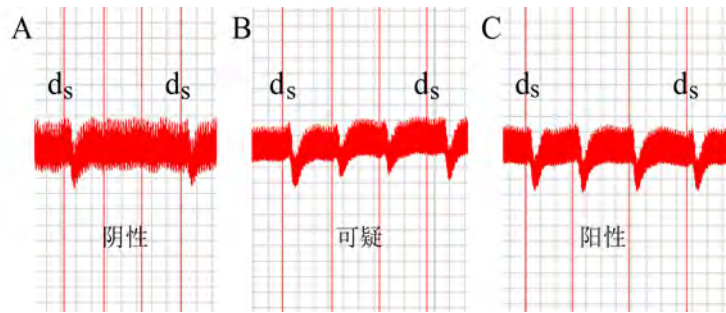
0.3倍时致麻醉猫血压下降的程度大于对照品所致反应量,结果呈阳性。其余3批制剂的结果呈阴性,具体见表4。

截取其中有代表性的猫血压变化图进行比较,可见结果为阴性的批次致猫血压变化不太明显,而结果为可疑或阳性的批次都会导致猫血压出现较为明显的下降,见图2。

表4 7批骨肽类注射剂用降压物质检查法检测结果
Table 4 Results of depressor substance test in 7 batches of osteopeptide injections

企业	制剂名	批次	猫血压下降数值/mmHg				d _T 与d _S /2、d _S 比较
			d _S	d _T	d _T	d _S	
A	复方骨肽注射液	A-1	34.26	19.49	19.97	31.18	1/2d _S <d _T <d _S
B	复方骨肽注射液	B-1	29.72	5.36	4.06	38.48	d _T <1/2d _S
C	骨肽注射液	C-1	40.27	24.68	24.03	37.35	1/2d _S <d _T <d _S
D	骨肽注射液	D-1	30.37	10.39	11.04	23.71	d _T <1/2d _S
	注射用骨肽	D-2	23.06	5.52	7.47	19.49	d _T <1/2d _S
E	骨肽注射液	E-1	39.78	43.84	43.52	36.37	d _T >d _S
	注射用骨瓜提取物	E-2	32.15	19.81	17.54	24.84	1/2d _S <d _T <d _S

注:d_S为对照品稀释液,d_T为供试品溶液。按照d_S、d_T、d_T、d_S这样的次序注射4个剂量为一组。



注:A,骨肽注射液(批次D-1)致猫血压变化;B,骨肽注射液(批次C-1)致猫血压变化;C,骨肽注射液(批次E-1)致猫血压变化。图中d_S为按顺序注入的对照品溶液。

图2 三种不同的典型骨肽类注射剂降压物质检查结果比较
Figure 2 Comparison of depressor substance test among the three typical osteopeptide injections

2.3 组胺类物质检查与降压物质检查结果比较

将组胺类物质检查法(即离体豚鼠回肠法)与猫降压物质检查法的实验结果比较,发现组胺类物质检查结果为阴性的骨肽类注射剂,其降压物质检查实验的结果也为阴性。企业A的复方骨肽注射液、企业C的骨肽注射液和企业E的注射用骨瓜提取物在组胺类物质检查中结果为可疑,降压物质检查结果也为可疑;企业E的骨肽注射液在组胺类物质检查中结果为可疑,在降压物质检查中结果为阳性。7批骨肽类注射剂采用两种方法检测的具体结果比较见表5。

3 讨论

本研究参照《中国药典》2020年版中第四部通则第1146条组胺类物质检查法和第1145条降压物质检查法分别进行实验。组胺类物质检查结果表明5家企业共7批骨肽类注射剂有4批制剂结果可疑,分别为企业A的复方骨肽注射液、企业C的骨肽注射液、企业E的骨肽注射液及注射用骨瓜提取物。对照猫降压物质检查结果,上述4批制剂中企业A的复方骨肽注射液、企业C的骨肽注射液和企业E的注射用骨瓜提取物的检

表5 7批骨肽类注射剂经组胺类物质检查与降压物质检查的结果比较

Table 5 Comparison between histamine-like substance test and depressor substances test on 7 batches of osteopeptide injections

企业	制剂名	批次	检查项	d_T 与 $d_S/2$ 、 d_S 比较	结果判定
A	复方骨肽注射液	A-1	组胺类物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑
			降压物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑
B	复方骨肽注射液	B-1	组胺类物质检查	$d_T < 1/2d_S$	阴性
			降压物质检查	$d_T < 1/2d_S$	阴性
C	骨肽注射液	C-1	组胺类物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑
			降压物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑
D	骨肽注射液	D-1	组胺类物质检查	$d_T < 1/2d_S$	阴性
			降压物质检查	$d_T < 1/2d_S$	阴性
	注射用骨肽	D-2	组胺类物质检查	$d_T < 1/2d_S$	阴性
			降压物质检查	$d_T < 1/2d_S$	阴性
E	骨肽注射液	E-1	组胺类物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑
			降压物质检查	$d_T > d_S$	阳性
	注射用骨瓜提取物	E-2	组胺类物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑
			降压物质检查	$1/2d_S < d_T < d_S$	可疑

注: d_S 为对照品稀释液, d_T 为供试品溶液。

查结果同样为可疑, 企业E的骨肽注射液检查结果呈阳性。其余3批制剂经组胺类物质检查与猫降压物质检查的结果均呈阴性。综上, 骨肽类注射剂7个批次的猫降压物质检查结果与组胺类物质检查结果相比较, 其中有6个相同批次的结果一致, 只有1批企业E的骨肽注射液组胺类物质检查结果为可疑, 而降压物质检查结果为阳性。考虑到动物的个体差异及灵敏度, 以及不同种属在剂量换算及判定标准中存在一定偏差, 鉴于两种测定方法在阴性结果及可疑结果检出较为一致, 总体实验结果一致率为85.7% (6/7), 可以认为基于离体豚鼠回肠法的组胺类物质检查法在骨肽注射剂的质量控制中, 可作为猫降压物质检查法的替代和补充。但是, 骨肽注射液中引起豚鼠回肠收缩的物质基础研究竟源于产品自身还是产品中成分刺激机体或组织释放产生, 还需进一步研究。

国内外药典收载的降压物质检查方法略有不同, 而各国药典大多仅收载猫降压实验, 部分药典同时收载猫降压实验和豚鼠回肠实验^[8-13]。因猫具有比较耐受麻醉、血压恒定、对组胺类物质反应灵敏、血管壁坚韧、便于手术操作和可反复应用等优点, 相较于兔

与比格犬等实验动物更适用于降压物质检查实验^[14-17]。但目前实验用猫的培育标准尚未统一, 具有生产资格的单位较少^[14, 18], 价格较高, 无法满足药品常规降压物质检查的需求, 多数实验室采用的为市售家猫。家猫来源复杂, 个体间差异大, 健康水平参差不齐, 无法对微生物寄生虫等进行控制, 可能给实验操作者带来较大安全隐患; 此外, 实验过程中存在动物有效保温、实验环境控制等较多不可控因素^[19-20]。组胺类物质检查法采用豚鼠离体回肠为实验对象, 动物来源、质量稳定可控, 符合动物实验的3R原则^[21], 且技术操作易于掌握, 还能有效避免内源性血压调节类物质对实验结果的影响, 故可作为猫降压物质检查法的替代和补充。

药品制剂的安全性检查对控制药品质量、保障用药安全具有重要意义。骨肽类注射剂为多组分生化注射剂, 提取工艺简单, 但质量可控性不够^[22], 制备过程中可能混入组胺或类组胺样降压活性物质, 影响药物的疗效或引起不良反应。因此, 对骨肽类注射剂中的组胺类物质应予以重视^[23-24]。对于成分复杂的多组分药物, 应根据其主要成分及临床应用选择适宜的检查方法。部分提取自植物的注射剂中存在有机酸等化学成分, 直接静脉注射即会引起急性降压, 导致猫降压物质检查法结果为假阳性, 对组胺类物质的判断产生干扰。因此, 该类注射剂宜采用离体豚鼠回肠法进行组胺类物质检查或验证。某些中药注射剂中存在平滑肌兴奋或抑制剂类成分, 影响离体豚鼠回肠法的结果判断, 故该类注射剂仍然推荐采用猫降压物质检查法。

[作者贡献]

吴畅: 实验设计, 完成实验, 数据收集和整理, 论文撰写和修改;

李晓洁、吴殷因、王瑶、汪玉馨、宗卫峰: 实验动物饲养管理, 参与实验设计, 实验辅助和技术指导, 数据分析指导, 辅助论文修改;

孟长虹、陆益红: 共同确定实验方案, 提供研究资金和实验场所, 实验指导, 论文指导和审核。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李凤林, 李文汉. 组胺受体研究的进展[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1983(2):85-89.
- [2] 马洁, 宋燕青. 骨肽注射液的临床应用及其药理作用[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(2):16-18.
- [3] 李治武. 骨肽和复方骨肽注射剂的不良反应分析[J]. 人人健康,

- 2018(4):222.
- [4] 国家药典委员会. 国家药品标准工作手册[M]. 4版. 北京: 中国医药科技出版社, 2013.
- [5] 付金凤, 齐洋. 猫血压法测定骨瓜提取物注射液降压物质方法的研究[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(4): 552-553. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2882.2011.04.016.
- [6] 牛慧玲, 李庆忠. 骨肽注射液降压物质检查法研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(6): 538-540. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407. 2012. 06.013.
- [7] 吴贤生, 黄甘泉, 杨嘉俊, 等. 注射用促肝细胞生长素中组胺类物质检查和降压物质检查的比较研究[J]. 实验动物科学, 2019, 36(2): 63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.012.
- [8] 国家药典委员会. 中国药典 2020 版. 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 182-183.
- [9] 国家药典委员会. 中国药典 2020 版. 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 516-520.
- [10] 吕晓君, 周大庆, 何开勇, 等. 不同药典降压物质检查方法的比较及试验要点浅析[J]. 中国药师, 2016, 19(8): 1571-1573, 1580. DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2016.08.048.
- [11] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia (9.0)[S]. EDQM, 2017: 195.
- [12] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia (BP9. 0)[S]. London: The Stationery Office, 2018.
- [13] 陈天焱, 邵文, 卢海霞. 降压物质检查法与组胺类物质检查法用于小牛血去蛋白提取物注射液质量控制的研究[J]. 中国药师, 2017, 20(12): 2264-2266.
- [14] 贺争鸣, 李根平, 朱德生. 实验动物管理与使用指南[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [15] 刘明慧, 袁宝, 陈健, 等. 猫实验动物标准化的研究进展及探讨[J]. 吉林畜牧兽医, 2015, 36(2): 29-30, 32.
- [16] 黎家敏, 马佳丽, 杨春, 等. 实验兔和猫在降压物质检查中的比较研究[J]. 实验动物科学, 2020, 37(5): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2020.05.001.
- [17] 嵇扬, 张葵荣, 姜春来. 比格狗与猫对组胺降压作用敏感性的比较研究[J]. 中国药品标准, 2004, 5(2): 38-39. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3656.2004.02.015.
- [18] 滑志民, 张似青, 陈菊红, 等. 实验用猫的历史、发展现状及发展前景[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019(1): 27-29.
- [19] 周立, 吕茂利, 吕文涛. 饲养犬、猫导致人兽共患寄生虫病的防治[J]. 中国伤残医学, 2012, 20(7): 144-144, 147. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6567.2012.07.108.
- [20] 邱鸿宇. 东北地区犬、猫人兽共患寄生虫的流行情况调查及风险因素分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020.
- [21] 胡楚元, 蔡拓, 吴军. 浅谈实验动物福利伦理工作现状及改进[J]. 中国畜禽种业, 2018, 14(9): 7-9.
- [22] 杨泽岸, 张媛, 吴彦霖, 等. 基于生物活性测定的骨肽类制剂质量评价方法[J]. 中国药事, 2019, 33(4): 380-384.
- [23] 邓利娟, 梁成罡, 范慧红. 几种多组分生化药注射剂降压物质的探讨[J]. 中国药事, 2010, 24(6): 546-549.
- [24] 黄甘泉, 吴贤生, 王凤姬, 等. 降压物质检查试验中家猫对组胺灵敏度分析[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 83-87. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 06. 011.

(收稿日期: 2021-04-12 修回日期: 2021-08-09)

(本文编辑: 张俊彦, 周晓铨)

书讯: 《眼科学动物实验基础与技术》



动物实验是医学科学发展的关键环节之一, 眼科学研究中动物实验也必不可少。随着我国经济和科技的高速发展, 眼科学研究迫切需要的仪器设备和试剂可以通过购买解决, 但开展动物实验的场所、人员、操作及管理规范相对滞后, 尤其是针对眼球开展的分析研究常常难以借鉴其他医学科学, 而且操作人员储备不足, 一线的年轻眼科研究人员及研究生常常感觉困难重重, 既缺乏有经验人员的指导, 又欠缺唾手可得的学习资料。同时, 我国大型眼科教学机构在教学过程中, 也没有系统性的眼科动物实验相关的教材。因此, 中山大学中山眼科中心整合眼科学国家重点实验室和眼科学实验动物中心的优质资源, 组织相关专家及具有丰富实际操作经验的专业人员, 倾力撰写了《眼科学动物实验基础与技术》一书。主编为吴开力教授和黄冰研究员。

本书详实全面, 系统地介绍了眼科动物实验相关理论与技术, 图文并茂, 科学实用, 内容包括开展眼科动物实验所需的场所、动物、设备、人员等管理规范和细则, 还包括动物实验实施中的操作技术详解及九大类 40 余种眼科学实验动物模型的制作方法和特点, 并且从实验动物眼的结构

基础、动物饲养方法及常见病防控, 到动物实验管理的各项制度制定及相关文件范例、动物实验操作和各类模型的制作, 都提供了实用、细致的指导。因此, 本书可作为学生自学和教师教学用书, 也可用作眼科学研究生的动物实验教学用书或专业培训教材。所有对眼科学动物实验有兴趣和希望利用实验动物开展眼科研究的人员和各类机构都可以将此书作为参考和指导。

本书已于 2022 年 3 月由人民卫生出版社出版, 16 开精装铜版纸彩色印刷, 共 74.2 万字, 474 页。如需购买请扫描右侧二维码。



《实验动物与比较医学》编辑部

电极植入猕猴脑皮层手术的护理实践及探讨

徐西彬, 朱 青, 张 恩

(北京师范大学认知神经科学与学习国家重点实验室, 北京 100875)

[摘要] 利用电极植入技术探讨群体神经元的电活动对于脑与认知科学、类脑研究和脑机接口技术研究是至关重要的。本文介绍了电极植入猕猴大脑皮层手术前、中、后的护理要点及其重要意义。其中, 术前护理包括术前准备、术前用药和头颅固定、备皮等, 术中护理包括生理指标监护和脑皮层植入手术护理, 术后护理包括观察监测、清创和营养护理。做好电极植入猕猴脑皮层手术的护理, 不仅能够提高手术成功率, 使用尽量少的实验动物来获取实验所需数据, 而且能够减轻手术给动物带来的疼痛和伤害, 对脑与认知科学研究和保障动物福利均具有重要意义。

[关键词] 电极植入; 脑皮层手术; 护理; 实验动物福利; 猕猴

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0166-05

Nursing Practice and Discussion of Electrode Implantation into Cerebral Cortex of Rhesus Monkey

XU Xibin, ZHU Qing, ZHANG En

(State Key Laboratory of Cognitive Neuroscience and Learning, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Correspondence to: ZHANG En, E-mail: ZhangEn@bnu.edu.cn

[ABSTRACT] The use of electrode implantation technology to explore the electrical activity of population neurons is crucial for brain and cognitive science, brain-like research and brain-computer interface technology research. This article introduces the nursing points and significance of electrode implantation in rhesus monkey cerebral cortex before, during and after operation. Preoperative care includes preoperative preparation, preoperative medication, cranial fixation, skin preparation, etc. Intraoperative care includes physiological index monitoring and cerebral cortex implantation surgery care, while postoperative care includes observation and monitoring, debridement and nutritional care. Doing a good job in the operation of electrode implantation into the cerebral cortex of rhesus monkeys can not only improve the success rate of the operation, use as few experimental animals as possible to obtain the data required for the experiment, but also reduce the pain and injury caused by the operation to the animals, which is of great significance for brain and cognitive science research and animal welfare protection.

[Key words] Electrode implantation; Cortical surgery; Nursing; Laboratory animal welfare; Rhesus monkeys

猕猴是最常见的非人灵长类实验动物。猕猴在生理机能、形态结构和生化代谢等许多方面都与人类高度相似。因此, 应用猕猴进行科学实验研究, 对理解人类自身至关重要。尤其是猕猴有发达的大脑皮层和复杂的认知能力, 是脑与认知科学研究领域中理想的实验模型动物^[1]。通常情况下, 经过一定训练的猕猴能够很好地完成实验所要求的认知任务。将电极植入

猕猴脑中可以对其大脑与认知功能进行研究, 尤其是在长期记录或刺激神经元活动的研究中该方法已被广泛应用, 具有重要的研究意义。

近年来, 本实验室采用先进的神经信号采集和处理技术, 多次将微电极阵列植入猕猴大脑皮层, 实现了对同一群神经元稳定且长期的跟踪, 揭示了猕猴在经过长期知觉训练后, 神经元和神经网络水平的可塑

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目: 视觉信息的多重表征及其经验依赖性(31771203)

[作者简介] 徐西彬(1978—), 男, 硕士, 实验师, 研究方向: 神经生物学。E-mail: xuxibin2004@bnu.edu.cn

[通信作者] 张 恩(1979—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 视知觉与知觉学习的神经机制。E-mail: ZhangEn@bnu.edu.cn

性变化过程及其与感知和行为的关系^[2-3]。然而,动物的机体功能状态会在电极植入手术后发生明显的改变,需要良好的护理工作以提高动物成活率,并促进动物机体快速恢复健康。本文根据本实验室在2019—2021年对猕猴脑皮层手术前后护理的实践探索经验,拟介绍与猕猴电极植入手术相关的实验动物护理和福利内容,供同行参考与借鉴。

1 实验动物与研究方法

2019—2021年,本实验室对6只猕猴在电极植入手术前后开展护理工作。所有猕猴均为雄性,体质量5~8 kg,年龄4~8岁,均购自北京中科灵瑞生物技术股份有限公司[SCXK(京)2018-0001]。实验动物在进入本实验室[SYXK(京)2015-0044、SYXK(京)2021-0003]的动物饲养房之前均进行了严格的检疫工作,B型疱疹病毒、各种肝炎病毒和结核杆菌等检测均为阴性(由苏州西山生物技术有限公司完成检测)。实验动物的使用和处理所涉及的各个环节均依据国家科学技术委员会颁发的《实验动物管理条例》执行,遵从《实验动物福利伦理审查指南》^[4]及实验动物相关福利要求^[5],并且通过北京师范大学动物伦理委员会批准[项目批准号为IACUC(BNU)-NKLCNL 2019-6]。

本课题组的相关研究通常需要猕猴在长达1~2个月的实验过程中,头部处于固定状态时能够观察并判断屏幕上的视觉图形,从而产生特定的学习效应,以此检测局部视觉特征差异并揭示其学习的神经机制^[6]。因此在正式实验前,需要通过外科手术,在猕猴的颅骨表面安装一个基座来固定头部。为了探讨这种学习行为背后的神经机制,还需要通过手术打开与研究相关脑皮层区所对应的颅骨区域,并将电极阵列埋藏于脑皮层的表面。这种电极移植手术可使研究者能够对该皮层区神经元的动作电位和局部场电位信号进行长期追踪,从而考察这些信号与认知及行为的关系。

2 电极植入脑皮层手术前护理

2.1 术前准备

手术前应完成猕猴的常规体检和生化指标检查,全面了解其各项机能,确保实验动物和工作人员的安全。由于猕猴对麻醉药品较敏感,在使用麻醉药品后可产生呕吐等不良反应,严重时呕吐物可进入呼吸道

导致吸入性肺炎。因此,全身麻醉前应至少禁食12 h,禁水2 h。

2.2 术前用药

猕猴在手术前12 h肌内注射类固醇地塞米松(0.5 mg/kg),以增强其抗病毒、抗炎性反应、抗过敏反应的能力。手术前30 min再次给予地塞米松肌内注射(0.5 mg/kg),肌内注射阿托品(0.05 mg/kg)和静脉注射安定(0.2 mg/kg),使动物镇静、肌肉松弛,并且抑制呼吸道的黏液分泌,减少唾液分泌,防止呕吐。20 min后再使用盐酸氯胺酮(80 mg/kg体质量,肌内注射)对猕猴进行基础麻醉。气管插管后转移到手术室,接医用呼吸麻醉机,用异氟烷(isoflurane, 1.0%~2.5%)进行深度麻醉。恒温热水毯置于猕猴周围以保持体温。

2.3 头颅固定及备皮

待猕猴进入稳定麻醉阶段后,借助动物立体定位仪来固定猕猴头颅。猕猴采取俯卧式,耳棒插入外耳孔,牙托固定下牙槽,同时为了使气道保持通畅,猕猴头颅应稍微背伸。另外为减少手术感染,应用推毛剪剃光猕猴头颅上的毛发,并用肥皂水刷洗,擦干后,用2%碘伏和75%乙醇溶液各擦洗消毒两次。为了更好地保证手术区的无菌状态,需要对手术部位为中心、周围8~10 cm的区域做备皮消毒处理。

3 电极植入脑皮层术中护理

3.1 生理指标的监护

猕猴被转移到手术室后,首先进行气管插管并建立静脉输液通道,连接麻醉呼吸机(购自北京航天长峰股份有限公司,型号ACM608)。整个手术过程中,通过气管插管输入含有1.0%~2.5%异氟烷的医用氧气以维持麻醉状态,并用生理监护仪(购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,型号PM-9000)密切观测猕猴的各项生理指标,包括心率、心电图、血压、血氧浓度、二氧化碳分压和肛温。若术中出现个别指标波动较大的情况,则适时做出相应的调整。诱导麻醉时,异氟烷体积分数可升高为2.0%~2.5%,以便猕猴快速进入麻醉状态,减少痛苦;诱导麻醉时间一般为10~30 min,此后维持麻醉的异氟烷体积分数为1.0%~1.5%。

麻醉所需异氟烷体积分数可根据动物的年龄、体质量、强健程度和所要进行的手术来确定。例如检测到麻醉程度不足(心率约在100以上),而此时异氟烷

体积分数在1%时,可适当增加其体积分数1.2%~1.5%,以减弱猕猴感觉上可能存在的不适或痛苦。

另外,麻醉手术会使动物产热减少,体温丢失,严重时可能导致动物术后无法恢复而死亡。因此在手术过程中,可使用恒温水循环装备(购自北京恒江仪器有限公司,型号YP-472)将加热垫置于猕猴周围以保持适当的体温,一般设定温度为40℃。循环水泵将加热的水均匀分布到加热毯上,这样可以减少手术风险,并使猕猴在手术后更快地复苏。麻醉手术过程中,动物的潮气量为50~60 mL;在皮肤缝合后,停止输送麻醉气体,潮气量变为40 mL。可以通过减少输送氧气的速度(氧流量从0.5减至0.3)来达到增加CO₂浓度、刺激呼吸的目的。

3.2 脑皮层植入手术

手术中使用Utah Array植入式微电极阵列(购自北京科圣科技有限公司,Blackrock Microsystem 型号6252)进行长期的电生理记录。电极阵列由阵列和基座组成,其中阵列部分的电极间距为400 μm,每个阵列通常有96或128根电极;基座部分用于将电极记录到的信号引出并连接至记录仪器,下有8个螺丝孔用于固定在颅骨上,基座与电极阵列间由柔性连接线相连。植入时,在猕猴大脑视皮层计划植入电极处切开一个尺寸约1.5 cm×1.5 cm的骨窗,并剪开硬脑膜,用配套的气动植入装置(购自北京科圣科技有限公司,Blackrock Microsystem)把电极植入皮层后,将硬脑膜缝合,盖回取下的骨片并使用钛网固定。电极基座使用钛合金骨钉固定在植入处旁边的颅骨上。缝合肌肉和皮肤,并使基座顶部暴露在外。由于猕猴手指较细,指甲通常较长,为了避免猕猴抓挠缝合线造成感染,一般需要用薇乔抗菌缝合线(美国强生Ethicon公司产品,型号4-0)采用皮下间断缝合的方法进行皮肤缝合,缝合后使用金霉素软膏涂抹切口。

在猕猴苏醒前,将其从立体定位仪上取下。并在它可以开始自主呼吸后,将气管插管去除,同时移去血氧饱和度监控器、心电图仪探头等监控设备。

4 电极植入脑皮层术后护理

4.1 苏醒环境

手术后应悉心护理和监护猕猴。猕猴苏醒期,取侧卧位,切口一侧朝上,放在宽敞的笼子里。低体重的猕猴放在加热毯上,保持干爽、温暖,并给予足够的垫料,避免碰撞,防止猕猴在麻醉未清醒期受伤。

准备高强度的照明设备,以便随时观察体温、呼吸、动物精神状态和术部情况等,看护30 min~2 h。四肢不便行动的动物定时翻身,交替左右侧卧,等动物完全清醒后再放回猴笼。在猕猴放回猴笼后的24 h内,每隔2~3 h持续观察其状态。术后2~4 h如果猕猴能站立起来,精神活泼,意识清醒,说明电极植入后颅内正常。如果术后4~6 h长时间不能清醒或者猕猴精神意识状态恶化,提示可能颅内因手术有继发出血,考虑再次手术清理出血块并处理出血点。

4.2 动物护理

术后的猕猴需要单笼喂养。在术后的一周内,每天给猕猴注射两次头孢曲松钠(1.0 g/次)来预防切口的感染,使用盐酸曲马多(2 mL: 100 mg)来为猕猴镇痛,肌肉注射一次30 mg,连续注射3 d。因为猕猴自身不能合成维生素C,为了促进手术切口的愈合,可以肌肉注射维生素C注射液(2 mL: 0.5 g),每日0.1~0.3 g,每天1~2次。另外为了减小感染风险,还需要在术后1周左右持续每天对电极连接器周围的组织进行清创:首先将清创的手术器械、纱布等用高压蒸汽灭菌锅消毒灭菌,并提前半小时打开手术室紫外灯进行环境消毒;然后更换一次性无菌手套,用碘伏擦拭消毒清理猕猴头部,用灭菌的手术刮勺仔细清理创口增生的息肉;最后用生理盐水和纱布保持创口清洁,达到实验的标准。

由于电极植入手术是异氟烷全身麻醉,麻醉时间长达68 h,术后易出现感染、体温降低、休克、呕吐和窒息等危险情况,一旦发现猕猴有胃内返流流出口腔,应立即清理清除。此外需要保持饲养环境温度在18~22℃,必要时使用电暖器进行取暖。此外,2~3 d定期更换清洁干燥的垫料。

全麻和手术导致的损伤通常会让猕猴食欲降低。在手术后的4~6 h内,由于吞咽肌功能还未能完全恢复,容易因为误吸导致死亡,因此不宜喂食喂水。这种情况下,需要细心观察猕猴的精神状态,选用少量柔软易消化的食物如香蕉、红薯等进行饲喂,一般根据动物年龄和恢复状况于手术完成12 h后饲喂正常饲料。

4.3 实验操作

脑皮层植入手术30 d后,猕猴身体基本恢复,即可以进行清醒猴实验。在整个清醒猴实验过程中,猕猴需要坐在特制的猴椅里。猴椅上装有让猕猴进行行为报告的拉杆装置,而视觉刺激是通过放在猴椅正前

方的显示器向猕猴呈现。此外,实验系统还配套有眼动跟踪系统和饮水奖励装置。实验过程中,猕猴可以通过拉杆和眼动对它所看到的视觉刺激进行报告,正确的报告将会使实验猕猴得到一定量的水或果汁作为奖励。

5 护理要点总结及讨论

6只猕猴的电极植入脑皮层手术均较成功,单次手术时间一般长约6~8 h。手术操作顺利,未出现感染和其他并发症。术后6~8 h猕猴即可进食,状态和机能恢复正常。因此,在手术前,需要充分准备好与动物手术和护理相关的仪器和耗材,且考虑到每一步细节和可能发生的意外。在手术过程中,需要关注手术对动物可能产生的伤害和痛苦,并尽可能地通过各种方式来降低或消除这些伤害和痛苦。

5.1 术前准备和麻醉选择

动物在麻醉前12 h进行禁食,有助于防止反胃和胃内容物流入气管对猕猴造成伤害。良好的麻醉前准备可以减少并发症,减轻动物疼痛,缩短麻醉诱导时间,有利于实验的顺利进行。采用氯胺酮作为诱导麻醉,肌肉注射10 mg/kg体质量,必要时可以追加1~2次。脑皮层植入手术时间较长,选择异氟烷气体吸入麻醉可使动物较快进入麻醉,且容易控制麻醉深度,安全性好,动物麻醉意外的发生率和死亡率低,手术成功率高,但需要购置呼吸麻醉机。

充分的麻醉准备不仅有利于获得良好的麻醉效果,更能充分体现3R原则,体现人道主义精神,从而更好地保证动物福利,确保动物实验结果的可靠性、可重复性和可信性^[7]。

5.2 脑皮层手术中情况处理

脑皮层手术根据麻醉过程中全身麻醉深度来进行相关操作。麻醉深度主要通过呼吸频率、心率、瞳孔、肌肉紧张度和二氧化碳含量等变化来判断。气管插管后接医用呼吸麻醉机,用异氟烷进行麻醉,10~20 min后观察麻醉深度。进入浅外科期时心率降低,对非疼痛刺激无肢体动作反应,以胸式呼吸为主,眼睑和角膜反射存在,此时可以固定猕猴头颅并备皮。麻醉深度进入深外科期后,心率和二氧化碳参数均有所下降,呼吸方式渐以腹式呼吸为主,瞳孔缩小,疼痛刺激不会引起有害的自主神经反射,开颅和脑皮层植入手术等操作应在这一时期进行。脑皮层手术应避免麻醉药物过量进入过深期,若出现此种状况应立即

停止手术,并使用肾上腺素等急救药品进行抢救。

猕猴的头皮松弛容易移动,可在开颅前用记号笔标记切口线。头部毛发在手术前剃尽,猕猴的头皮较薄,缺乏皮下组织支持^[8]。皮肤切开后止血以无菌纱布压迫止血为主,头皮出血尽量少用止血电凝,以免皱缩而影响切口愈合。颅骨出血时涂抹骨蜡止血,开颅后操作应尽量仔细、轻柔,减少损伤和出血,视皮层小静脉出血后用双极电凝止血。硬脑膜应尽量缝合,然后再缝合头皮,防止脑脊液渗漏。

5.3 术后感染防护

术后的感染可能与多种因素有关。实验动物手术后恢复情况除了与术中操作、清创、动物抵抗力有关外,也与术后的护理有关,有时护理不良甚至会导致术后感染。术前护理是基础,术后护理是保障,做好护理能够有效降低动物手术死亡率,提高手术动物生活质量和手术成功率,避免不必要的重复手术和实验,可以将实验动物的使用量降到最低^[9],同时减轻对动物造成的疼痛和伤害,尽最大限度使用较少量动物获取实验所需数据,保障动物福利,保证后续科研实验结果的准确性,促进认知神经科学研究的良性发展^[10]。

综上,在进行猕猴脑皮层手术的前、中、后期加强实验动物护理和福利很重要。其中,手术前应进行细致和耐心的准备和检查;手术过程中进行严密的手术操作和手术监护,尽量将皮层植入手术中发生风险的可能性降到最低,保证植入手术的成功率;手术后进行密切监测和精心护理,缓解动物疼痛并加强动物营养,保证动物健康生存及福利。实践证明这些护理工作有助于保障猕猴术前的正常训练、手术的顺利进行,以及术后的机能恢复,是整个实验研究中不可或缺的部分。

【作者贡献】

徐西彬:负责电极植入猕猴脑皮层手术,完成相关论文资料的收集、整理分析以及文章撰写。

朱青:负责术后护理猕猴,参与文献资料的分析和整理,对论文进行修改校正。

张恩:获取科研经费,对研究数据进行分析,对本文内容进行审阅和技术性指导。

【利益声明】所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献】

- [1] 王宏. 实验猕猴在生物医学研究中的福利管理[J]. 生命科学, 2020, 32(7):711-716. DOI:10.13376/j.cbbs/2020089.
- [2] LI Z, YAN A, GUO K, et al. Fear-related signals in the primary

- visual cortex[J]. Curr Biol, 2019, 29(23): 4078-4083. e2. DOI: 10.1016/j.cub.2019.09.063.
- [3] CHEN R J, WANG F, LIANG H L, et al. Synergistic processing of visual contours across cortical layers in V1 and V2[J]. Neuron, 2017, 96(6):1388-1402. e4. DOI:10.1016/j.neuron. 2017. 11.004.
- [4] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10):133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.023.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 福利伦理审查指南: GB/T 35892—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [6] YAN Y, ZHAOPING L, LI W. Bottom-up saliency and top-down learning in the primary visual cortex of monkeys[J]. PNAS, 2018, 115(41):10499-10504. DOI:10.1073/pnas.1803854115.
- [7] 陶钧, 赵厚德, 郝智慧, 等. 实验动物麻醉前的准备工作[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(3):58-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2005.03.019.
- [8] 柯以铨, 李钢, 徐如祥, 等. 猕猴开颅手术的方法与体会[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(5):315-317. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2003.05.017.
- [9] 慎慧, 吴爱丽, 孙嘉康, 等. 实验动物体外循环术后护理与福利[J]. 实验动物科学, 2007, 24(增刊):17-20.
- [10] 马小根, 王晓静, 高源. 基于动物 3R 原则的生理学实验教学改革[J]. 河南农业, 2018(12):33-34. DOI:10.15904/j.cnki.hnny. 2018. 12.016.
- (收稿日期:2021-04-07 修回日期:2021-09-23)
(本文编辑: 张俊彦, 任益凡)

《中华人民共和国生物安全法》：防控重大新发突发传染病、动植物疫情

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过，自2021年4月15日起施行。

第三章 防控重大新发突发传染病、动植物疫情

第二十七条 国务院卫生健康、农业农村、林业草原、海关、生态环境主管部门应当建立新发突发传染病、动植物疫情、进出境检疫、生物技术环境安全监测网络，组织监测站点布局、建设，完善监测信息报告系统，开展主动监测和病原检测，并纳入国家生物安全风险监测预警体系。

第二十八条 疾病预防控制机构、动物疫病预防控制机构、植物病虫害预防控制机构（以下统称专业机构）应当对传染病、动植物疫病和列入监测范围的不明原因疾病开展主动监测，收集、分析、报告监测信息，预测新发突发传染病、动植物疫病的发生、流行趋势。国务院有关部门、县级以上地方人民政府及其有关部门应当根据预测和职责权限及时发布预警，并采取相应的防控措施。

第二十九条 任何单位和个人发现传染病、动植物疫病的，应当及时向医疗机构、有关专业机构或者部门报告。医疗机构、专业机构及其工作人员发现传染病、动植物疫病或者不明原因的聚集性疾病的，应当及时报告，并采取保护性措施。依法应当报告的，任何单位和个人不得瞒报、谎报、缓报、漏报，不得授意他人瞒报、谎报、缓报，不得阻碍他人报告。

第三十条 国家建立重大新发突发传染病、动植物疫情联防联控机制。发生重大新发突发传染病、动植物疫情，应当依照有关法律法规和应急预案的规定及时采取控制措施；国务院卫生健康、农业农村、林业草原主管部门应当立即组织疫情会商研判，将会商研判结论向中央国家安全领导机构和国务院报告，并通报国家生物安全工作协调机制其他成员单位和国务院其他有关部门。发生重大新发突发传染病、动植物疫情，地方各级人民政府统一履行本行政区域内疫情防控职责，加强组织领导，开展群防群控、医疗救治，动员和鼓励社会力量依法有序参与疫情防控工作。

第三十一条 国家加强国境、口岸传染病和动植物疫情联防联控能力建设，建立传染病、动植物疫情防控国际合作网络，尽早发现、控制重大新发突发传染病、动植物疫情。

第三十二条 国家保护野生动物，加强动物防疫，防止动物源性传染病传播。

第三十三条 国家加强对抗生素药物等抗微生物药物使用和残留的管理，支持应对微生物耐药的基础研究和科技攻关。县级以上人民政府卫生健康主管部门应当加强对医疗机构合理用药的指导和监督，采取措施防止抗微生物药物的不合理使用。县级以上人民政府农业农村、林业草原主管部门应当加强对农业生产中合理用药的指导和监督，采取措施防止抗微生物药物的不合理使用，降低在农业生产环境中的残留。国务院卫生健康、农业农村、林业草原、生态环境等主管部门和药品监督管理部门应当根据职责分工，评估抗微生物药物残留对人体健康、环境的危害，建立抗微生物药物污染物指标评价体系。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)